
Evaluation des Sphingolipid- und IL-33/ST2-Signalwegs als Quelle für diagnostische Biomarker für die limitierte Form der systemischen Sklerose

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium genehmigte

Dissertation

von Diplom-Biologin

Annika Wagner

aus Schorndorf

1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß

2. Referentin: Prof. Dr. M. Cristina Cardoso

Tag der Einreichung: 19. März 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 2015

Darmstadt 2015

D 17

„Mühsam ernährt sich das Eichhörnchen.“
Spruchwort

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	II
2. Zusammenfassung	1
3. Einleitung	3
3.1. Sklerodermie	3
3.2. Pathogenese	5
3.3. Klinisches Erscheinungsbild	12
3.4. Klassifizierung der Sklerodermie	17
3.5. Diagnostik der systemischen Sklerose	19
3.6. Therapie und Rehabilitation	23
3.7. Biomarker für die systemische Sklerose	25
4. Zielsetzung	37
5. Material	38
5.1. Geräte	38
5.2. Chemikalien	39
5.3. Lösungen	39
5.4. Kits	40
5.5. PC-Software	40
5.6. Normal- und Patientenkollektiv	41
6. Methoden	45
6.1. Methodik der klinischen Untersuchungen	45
7. Ergebnisse	52
7.1. Klinische Daten der SSc-Patienten- und Vergleichskollektive	52
7.2. Proteinanalytik des SSc-Patientenserums mit Fokus auf IL-33 und seinen Rezeptor ST2	60
7.3. Massenspektrometrische Analyse der Sphingolipid-Profile in SSc-Patienten	63
7.4. Serumspiegel bekannter Dermatofibrosemarker im Vergleich zu IL-33/ST2 und den Sphingolipiden	77
7.5. Evaluation zusätzlicher Zytokine und Chemokine als serologische Biomarker für die SSc mittels Proteinarray	84
7.6. Modulation der Parameter S1P, dhS1P und ST2 durch Therapie mit Iloprost	87
8. Diskussion	91
8.1. Analyse und Vergleich der untersuchten Patientenkollektive	92
8.2. Proteinanalytik des SSc-Patientenserums mit Fokus auf IL-33 und seinem Rezeptor ST2	96
8.3. Analyse der Sphingolipid-Profile in SSc-Patienten	102

8.4. Dermatofibrosemarker und die Korrelation mit den Sphingolipiden	108
8.5. Zusätzliche Untersuchung EC-relevanter Signalmoleküle	112
9. Appendix	114
9.1. Ehrenwörtliche Erklärung	114
9.2. Abbildungsverzeichnis	115
9.3. Tabellenverzeichnis	117
9.4. Abkürzungsverzeichnis	118
9.5. Literaturverzeichnis	120
10. Veröffentlichungen	143
11. Danksagung	144
12. Lebenslauf	145

2. Zusammenfassung

Die Pathophysiologie der systemischen Sklerose (Sklerodermie, SSc) ist bisher unvollständig erforscht. Die Sklerodermie ist eine immun-medierte Systemerkrankung, gekennzeichnet durch eine Fibrose des Bindegewebes. Die unklare Pathophysiologie erschwert eine frühzeitige Diagnose und therapeutische Intervention bei den Patienten. Es wird angenommen, dass die vaskulären Endothelzellen, insbesondere die der mikrovaskulären Gefäße, eine wichtige Rolle zu Beginn der Erkrankung einnehmen. Erste sichtbare Anzeichen einer gestörten Mikrovaskulatur sind in über 90 % der SSc-Patienten bereits vor einer gesicherten Diagnose mittels Kapillarmikroskopie nachweisbar (1, 2). Inwiefern die Moleküle des Sphingolipid-Signalwegs und der IL-33/ST2-Achse sich für die Sklerodermie als serologische Biomarker eignen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Dabei lag das Augenmerk auf der Evaluation eines Biomarkers(-Panels) zur Diagnose der Sklerodermie oder der Verlaufskontrolle bei Medikation der Sklerodermie-Patienten. Zum einen wurden Serumproben von 69 Patienten mit limitierter systemischer Sklerose (lcSSc), zwanzig Patienten mit diffuser SSc sowie zehn Patienten im frühen Stadium der SSc (LeRoy) aus Schweden und Deutschland untersucht. Als Kontrollgruppen fungierten gesunde, dem Alter und Geschlecht der SSc-Patienten angepasste, Individuen (n = 38) sowie elf Patienten mit dem idiopathischen, primärem Raynaud-Phänomen. Bei den deutschen Individuen wurde eine Kapillarmikroskopie durchgeführt. Es wurden Plasmaproben von 175 schwedischen lcSSc-Patienten und entsprechenden 112 gesunden Probanden analysiert. Die Sphingolipid- und Glucosyl-Ceramide-Profile wurden mittels LC-MS/MS erhoben, während die Konzentrationen weiterer Proteinparameter, IL-33, sST2, DKK-1 und den Dermatofibrosemarkern COMP sowie Lysyl-Oxidase, mit spezifischen ELISA untersucht wurden. Ebenso wurde der modifizierte Rodnan-Skin-Score (mRSS) erhoben. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test oder dem Spearmans Korrelationskoeffizient. Die deutschen und schwedischen lcSSc-Patienten (n = 77) zeigten einen lcSSc-typischen Auto-Antikörpertiter. Bei den deutschen lcSSc-Patienten konnten keine Auffälligkeiten in der klinischen Chemie und Hämatologie gefunden werden. Bei diesen 26 Patienten konnte bei der kapillarmikroskopischen Untersuchung die, für die SSc-charakteristische Verringerung der Kapillardichte und die Megakapillaren im Vergleich zu elf 1.RP-Patienten und drei gesunde Probanden nachgewiesen werden. Die schwedischen lcSSc-Patienten (n = 44) wiesen im frühen Stadium der lcSSc vermehrt einen frühen oder aktiven und bei fortgeschrittener Krankheit den späteren Kapillarstatus auf. Im Serum der lcSSc-Patienten war IL-33 nicht erhöht. Der sST2-Serumspiegel war bei lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als neun

Jahren (n = 29) im Vergleich zu dcSSc-Patienten (n = 20) oder früheren Stadien der lcSSc (Krankheitsdauer ein bis drei Jahren, n = 15) deutlich höher. Der sST2-Spiegel korrelierte in SSc-Patienten (n = 95) positiv mit der Krankheitsdauer. In einem auf Zytokine spezialisiertem Assay konnte gezeigt werden, dass auch PDGF-AB/BB, IL-4, EMMPRIN, IL-1ra und ENA-78 in vier lcSSc-Patienten verglichen mit vier alters- und geschlechtsübereinstimmenden Kontrollindividuen erhöht waren. Im Serum zeigte sich ein länderspezifischer Unterschied zwischen deutschen und schwedischen Individuen. In der deutschen Kontrollgruppe (n = 10) waren die S1P-Spiegel signifikant niedriger als in der schwedischen (n = 10). Die gemessenen Ceramid-Konzentrationen unterschieden sich hingegen nicht. Die Sphingosin-Serumkonzentrationen waren, normiert auf die Mittelwerte der jeweiligen gesunden Probanden, bei lcSSc-Patienten (Krankheitsdauer ein bis drei Jahren, n = 15; Krankheitsdauer vier bis neun Jahren, n = 14) im späteren Krankheitsstadium im Vergleich zu den 1.RP-Patienten erhöht. Der S1P-Spiegel der SSc-Patienten (n = 95) korrelierte mit der Erkrankungsdauer, dem COMP-, dem DKK-1- (n jeweils 95) und dem Lysyl-Oxidase-Serumspiegel (n = 33). Ein Zusammenhang zwischen der Erkrankungsdauer dem S1P-, COMP-, DKK-1- (n jeweils 95) und dem Lysyl-Oxidase-Serumkonzentrationen (n = 33) wurde nachgewiesen. Untersuchungen der Plasmaproben von schwedischen 175 lcSSc-Patienten und 112 gesunden Probanden zeigten, dass C18:0- sowie C24:1-Ceramid und das C16:0-Dihydroceramid bei den Patienten erhöht war. Ebenso war S1P und das Glucosyl-Ceramid C24:1 lcSSc-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe höher. Die Sphingosin-Serumspiegel waren bei den lcSSc-Patienten leicht erhöht. Erste Ergebnisse einer klinische Studie mit sieben lcSSc-Patienten, die eine vasodilatorische Therapie (Iloprost) erhielten, zeigten eine deutliche Zunahme der S1P- und dhS1P-Spiegel am Ende der Behandlung. Damit könnte sich S1P als serologischer Marker für den Behandlungserfolg nach einer Iloprost-Therapie eignen. Die hier untersuchten Sphingolipide, u. a. S1P, und sST2 unterstreichen, insbesondere unter Einbezug ihrer Serumspiegelveränderungen nach einer Iloprost-Therapie, die pathophysiologische Bedeutung der Endothelzellen bei der Sklerodermie. S1P, welches sowohl pro- als auch anti-fibrotisch agiert und zu großen Teilen in Endothelzellen produziert wird (3) und sST2, welches bereits als Marker für fibrotische Erkrankungen beschrieben wurde (4), könnten über das direkt auf Endothelzellen wirkende Iloprost modifiziert werden. Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass sST2 und spezifische Sphingolipide neue Zielmoleküle für ein Biomarkerpanel zur exakteren und möglicherweise frühzeitigeren Diagnose der lcSSc sind und die hier dargestellten Ergebnisse deutlich auf eine Beteiligung der Sphingolipide und der IL-33/ST2-Achse in der Pathophysiologie der Sklerodermie hinweisen.

3. Einleitung

3.1. Sklerodermie

Die Sklerodermie (engl. *scleroderma*) zählt zu den Kollagenosen, einer Gruppe immun-medierter Systemerkrankungen des Bindegewebes. Bereits 1847 wurde die Bezeichnung „Sklerodermie“ von Gintrac (5) definiert. Sie nimmt Bezug auf das charakteristische klinische Merkmal der Erkrankung und bedeutet im Griechischen „harte Haut“ (griechisch *sklēros* = hart, *derma* = Haut). Kennzeichnend für die Erkrankung ist eine generalisierte Fibrose und Sklerose des Bindegewebes mit ausgeprägter Beteiligung der Haut, der Blutgefäße und der Lunge (6). Aufgrund der kennzeichnenden Autoantikörper, die bei bis zu 90 % der Patienten nachweisbar sind, wird die Sklerodermie zu den Autoimmunerkrankungen gezählt (7).

Abhängig von der Ethnizität werden starke Schwankungen in der Prävalenz und Inzidenz der Sklerodermie beschrieben. Die Prävalenz der Sklerodermie wird auf 4 - 658,6 Patienten pro 1 Millionen Einwohner geschätzt (8–12). Die Inzidenz variiert dementsprechend stark von 3,7 - 23 neuen Patienten pro 1 Millionen Einwohner und Jahr (12). Frauen sind annähernd viermal häufiger betroffen als Männer. Die Erkrankung manifestiert sich vorwiegend zwischen dem fünfundvierzigsten und sechzigsten Lebensjahr (13). Bei Kindern und Jugendlichen tritt die Erkrankung seltener auf als bei Erwachsenen. Das größte Risiko birgt eine familiäre Prädisposition. Im Vergleich zu der Normalbevölkerung ist das absolute Risiko für das jeweilige Familienmitglied kleiner als ein Prozent (14). Abhängig von dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, der Ethnizität, der Ausprägung, Schwere der Organbeteiligung und dem Geschlecht, weist die Sklerodermie eine verringerte kumulative Überlebensrate auf. Beruht die Diagnose auf dem ersten Auftreten des Raynaud-Phänomens, liegt die kumulative 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung bei 87,6 %, die 10-Jahres-Überlebensrate bei 74,2 % (15). Liegen der Beurteilung keine Raynaud-Symptome zugrunde, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 74,9 % (62,5 % in der 10-Jahres-Überlebensrate) nach Auftreten des Befunds. Die häufigste Ursache für die gesteigerte Mortalität ist die Lungenbeteiligung, gefolgt von kardiovaskulären Ereignissen (16).

Bei der Sklerodermie differenziert man zwischen zwei Hauptformen: die lokalisierte Sklerodermie und die systemische Form, auch systemische Sklerose (SSc, engl. *systemic sclerosis*) genannt (siehe Abbildung 1).

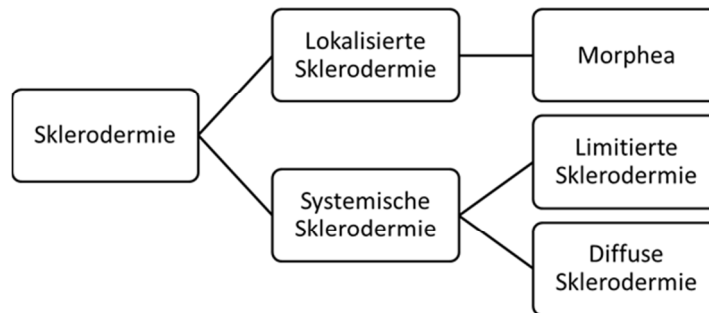


Abbildung 1: Formen der Sklerodermie. Schematische Darstellung der Subgruppen der Familie der Sklerodermie-Erkrankungen (angelehnt an: Scleroderma Foundation (www.scleroderma.org)).

Weiterhin lassen sich bei der systemische Sklerose zusätzliche Subtypen abgrenzen: die häufigsten Formen stellen die vorwiegend auf die Haut limitierte SSc (lcSSc, engl. *limited cutaneous SSc*) und die diffuse SSc (dcSSc, engl. *diffuse cutaneous SSc*) (17) dar. Daneben unterscheidet man sich mit anderen immun-medierten Erkrankungen überschneidende Form (Overlap, etwa 11%), die undifferenzierte SSc (etwa 8%) und die Sklerosis sine Sklerodermie (etwa 1%).

Bei der limitierten SSc handelt es sich um die mildere Verlaufsform der systemischen Sklerose. Sie zeichnet sich durch einen langsamen Progress der Erkrankung und zumeist keiner Beteiligung der inneren Organe aus. Eine Beteiligung der inneren Organe durch Fibrosierung des Bindegewebes setzt, wenn überhaupt, erst sehr spät im Krankheitsverlauf ein. Allerdings ist bei dieser Form die Inzidenz für das Auftreten eines pulmonal-arteriellen Hochdrucks (PAH) als limitierenden Faktor für die Mortalität höher als bei der diffusen Form. Typischerweise lassen sich bei dieser Form Anti-Zentromer-Antikörper nachweisen. Bei der diffusen Verlaufsform kommt es innerhalb weniger Monate bzw. Jahre zu einer deutlichen Zunahme der Hautverdickung und der Beeinträchtigung der Funktion von Herz, Lunge, Ösophagus sowie des Bewegungsapparats. Je stärker die Beteiligung der Haut bei der dcSSc ausgeprägt ist, desto wahrscheinlicher entwickeln sich neue Organmanifestationen. Beide Subtypen werden im Detail in den nachfolgenden Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 abgehandelt.

3.2. Pathogenese

3.2.1. Vaskulopathie und Fibrose

Bisher sind die auslösenden Faktoren der Sklerodermie unvollständig erforscht. Ein Zusammenhang zwischen den beiden Hauptmerkmalen der SSc, der Vaskulopathie und der Dermatofibrose, scheint wahrscheinlich. Es wird angenommen, dass die zu Beginn stattfindenden vaskulären Veränderungen mit den einhergehenden Endothelzellschäden, der anschließenden Fibrose zugrunde liegen. Obwohl der genaue Vorgang der vaskulären Schädigung bisher nicht erklärt werden kann, gibt es deutliche Anzeichen, die für eine Endothelzellschädigung sprechen. Dazu zählen erhöhte Endothelin-1-Konzentrationen im Serum von SSc-Patienten (18), ebenso wie erhöhte Serumspiegel des löslichen Adhäsionsmoleküls VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule*; vaskuläres Zelladhäsionsmolekül) (19). VCAM-1 ist ein Marker der Endothelzellaktivierung, da es selektiv von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird. Bereits 1995 konnte ein Zusammenhang zwischen dem zirkulierenden, löslichen VCAM-1 und der Krankheitsaktivität der Sklerodermie nachgewiesen werden (20). Endothelin-1 (ET-1) ist hingegen ein endogenes Signalmolekül und vermittelt unter anderem Fibrose sowie Inflammation. Es wird vermutet, dass hohe ET-1-Konzentrationen im Serum zu einer Stimulierung des ET-1-Rezeptors ET-A führen (18). Dieser wird hauptsächlich auf vaskulären, glatten Muskelzellen exprimiert, führt zu einer andauernden Vasokonstriktion und Minderversorgung des umliegenden Gewebes. Der zweite ET-1-Rezeptor ET-B, welcher vorwiegend auf Endothelzellen exprimiert wird, scheint bei SSc-Patienten herunterreguliert. Er vermittelt die Vasodilatation. Eine veränderte Expression der ET-1-Rezeptoren und eine erhöhte ET-1-Serumkonzentration führen zu einem Ungleichgewicht, welches die Progression der Pathogenese fördert (21). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in frühen Stadien der Sklerodermie die Stickstoffmonoxid-(NO)-Spiegel im Blut der Patienten erhöht sind (22–24). NO, ein freies Radikal, zählt zu den Schlüsselmediatoren des oxidativen Stresses. Es wird in neuronalen Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen von der NO-Synthase (NOS) konstitutiv produziert. Durch inflammatorische Stimuli kann eine Induktion der induzierbaren NOS (iNOS) und die daraus resultierende erhöhte NO-Serum-Konzentration entstehen. Es wird vermutet, dass der oxidative Stress ein möglicher, ursächlicher Faktor der bei Endothelzellschädigung ist. Bei der Leberfibrose ist belegt, dass die Generation reaktiver oxygenen Spezies (ROS) über die NADPH-Oxidasen (NOX) eine essentielle Rolle spielt (25). Einhergehend mit der Schädigung durch ROS des Gefäßbettes, wird ein gestörter Wundheilungsmechanismus aktiviert. Es wird postuliert, dass dieser bei SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden

Individuen gestört ist. Als Resultat einer chronischen Entzündung oder einer chronischen Gewebsschädigung, gerät die Balance anti-fibrotischer und pro-fibrotischer Prozesse aus dem Gleichgewicht. Es kommt zu einer übermäßigen Produktion an extrazellulärer Matrix (ECM, engl. *extracellular matrix*), die eine Vernarbung des betroffenen Gewebes und eine Funktionseinschränkung der betroffenen Organe zur Folge hat. Eine besondere Rolle nehmen hierbei die Fibroblasten ein. Sie zählen zu den mesenchymalen Zellen und sind der hauptsächlich vorkommende Zelltyp des Bindegewebes. Sie sind in einer netzartigen Matrix aus fibrösen Proteinen und Glykosaminyglykanen (GAG) eingebettet. Zu Letzteren zählen Heparansulfat, Dermatansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure. In der ECM bilden die GAGs bis auf die Hyaluronsäure Proteoglykane, deren Hauptaufgaben Speicherung von Wasser, Unterstützung der Selbstassemblierung der ECM, Vermittlung der Zell-Zell-Kommunikation via Zytokine und Chemokine sind. Die Grundsubstanz, die vorwiegend aus GAGs besteht, wird von Fasern modelliert. Diese Fasern setzen sich aus unterschiedlichen, fibrösen Proteinen zusammen. Neben den Kollagenfasern durchziehen Elastin, Fibronectin und Laminin die ECM. Kollagenfasern sorgen für die Zugfestigkeit des umliegenden Gewebes, während die Elastizität durch Elastinfasern gewährleistet wird. Fibronectin und Laminin bilden zusammen mit Kollagen die Basallamina und vermitteln dadurch den Zell-ECM-Kontakt. Zusätzlich dazu ist das Fibronectin ein wichtiger Mediator der Zellwanderung einzelner Zellen. Fibroblasten produzieren einen Großteil aller ECM-Bestandteile und geben diese via Exozytose in die umgebende ECM ab. Hauptaufgabe der Fibroblasten ist die kontinuierliche Produktion der ECM, wodurch die Strukturgebung des Gewebes gewährleistet wird. Weiterhin sind sie auch an der Wundheilung, Entzündungsreaktionen und der Angiogenese beteiligt. Fibroblasten reagieren auf eine Vielzahl an parakrinen und autokrinen Stimuli, darunter Zytokine und Wachstumsfaktoren. In der systemischen Sklerose spielen die Fibroblasten eine wichtige Rolle in der pathologischen Fibrose. Wie bereits erwähnt, kommt es bei der Fibrose zu einer exzessiven Produktion an ECM. Dies resultiert aus der Aktivierung und der angenommenen mesenchymalen Dedifferenzierung der Fibroblasten. Unter normalen Bedingungen reagieren Fibroblasten auf eine Verletzung des Gewebes mit der Invasion in das betroffene Gewebe. Dort proliferieren sie und produzieren verstärkt Komponenten der ECM. Dadurch wird der Wiederaufbau der ECM in dem verletzten Gebiet ermöglicht. Bei gesunden Individuen entwickeln sich die Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese Transition wird durch pro-fibrotische Signalmoleküle bewirkt. Dazu zählen Chemokine, Zytokine und durch oxidativen Stress produzierte reaktive-oxygen Moleküle. Die Myofibroblasten besitzen die Eigenschaft, hinreichend kontraktile Fasern zu produzieren, um z. B. offene Wunden zu schließen. Sobald die Wundheilung abgeschlossen ist, verschwinden diese

Myofibroblasten durch Apoptose (26, 27). Bei der Sklerodermie findet in dem betroffenen Gewebe die Transition der Fibroblasten statt, und es kommt zu einer erhöhten Produktion von Kollagen I und V (28). Gleichzeitig kann die sogenannte *Endothelial-to-Mesenchymal-Transition* (EndMT) ablaufen. Endothelzellen, die sich zu Myofibroblasten entwickeln, verstärken den pro-fibrotischen Effekt (29). Bisher ist nicht bewiesen, ob zuerst die EndMT abläuft und ruhende Fibroblasten mit Hilfe von Signalmolekülen aktiviert und zur Transition anregt werden oder, ob die aus Fibroblasten hervorgegangenen Myofibroblasten die EndMT aktivieren.

3.2.2. Genetische Komponenten

Bisherige Untersuchungen konnten belegen, dass, neben einer positiven Familienanamnese, unterschiedliche genetische Prädispositionen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führen. Die ersten genetischen Studien zur SSc wiesen auf eine Assoziation spezifischer Allelen in der Region des humanen Leukozytenantigens (HLA) und der Sklerodermie hin (30–32). Neuere Ergebnisse von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) bezüglich der Funktionen von Immunregulation, Inflammation, DNA-Synthese sowie Zelldifferenzierung und -morphogenese deuten auf weitere genetische Assoziationen mit der Sklerodermie hin (

Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht bekannter, mit SSc assoziierten Genen und deren Funktionen (verändert nach (33))

	Immunregulation	Inflammation	DNA-Synthese	Zelldifferenzierung/ Zellmorphogenese
Gen-Funktion	T-Zellen: Differenzierung Proliferation Aktivierung	Regulation: Zytokinen Monokinen	Transkription	Bestimmung des Zellschicksals/ Zellüberlebens
	B-Zell-Signalisierung	Interferon- Regulation	DNA- Spaltung	
	Angeborene Immunantwort	NF-κ-B Signalisierung		
		Produktion: Cytokine Chemokine		

Maßgeblich bei der Pathogenese der SSc scheint die Beteiligung der HLA-Region zu sein. Es handelt sich bei dem HLA-System um ein System individuell einzigartiger Gewebsantigene, wobei die „class II major histocompatibility antigens“ (MHC-II) vorwiegend auf exogene Antigen-aufnehmende antigen-präsentierenden Zellen zu finden ist, während die MHC-I Genprodukte HLA-A, -B, -C beim Menschen auf fast allen nukleären Zellen nachweisbar ist. Inzwischen wurden als Gewebsantigene weitere, außerhalb der Genloci von MHC-I und -II liegenden MHC-III und „minor histocompatibility antigens“ definiert. Besonders wichtig ist das HLA-System bei der Aktivierung von T-Lymphozyten und der Induktion einer „MHC-restringierten“ spezifischen Immunantwort. Bei über 1000 SSc-Patienten konnten die frühen Befunde von Gladman, Hughes und Kallenberg aus den Anfängen der Neuzeinhundertneunziger Jahre bezüglich der Assoziation der MHC-II-Region mit SSc bestätigt werden (34–36). Weiterhin zeichnet sich die MHC-II-Region durch eine Korrelation spezifischer Gene mit dem Autoantikörper-Status der Sklerodermie-Patienten aus. Die Epitope HLA-DQB1*0501 und DQB1*26 korrelieren stark mit der Präsenz von Anti-nukleären Antikörpern (ANA), wohingegen die Haplotypen HLA-DPB1*1301, HLA-DRB1*1104, DQA1*0501 und DQB1*0301 spezifisch für das Vorliegen von Anti-Topoisomerase-Antikörpern sind (37, 38).

Im Bereich der Immunmodulation zählen STAT4 (engl. *signal transducer and activators of transcription-4*) und T-bet (engl. *t-box transcription factor*) ebenfalls zu den mit der Sklerodermie assoziierten Genen. STAT4 ist ein Transkriptionsfaktor, der im Zusammenspiel mit IL-12p70 die T-Zelldifferenzierung in Richtung einer Th1-Differenzierung beeinflusst. In dem von STAT4 aktivierten Signalweg folgt dann die Hochregulation des Transkriptionsfaktors T-bet, der als „master switch“ das Muster der typischen autoimmunen Entzündungsreaktion steuert, u. a. Interferon- γ , CXCR3-Liganden und weitere zytotoxische Effektormechanismen. Eine veränderte Expression von STAT4 und T-bet kann die Wahrscheinlichkeit erhöhen an SSc zu erkranken (39, 40).

Zu weiteren, mit einer Typ-I-Interferon-assoziierten Immunpathogenese mutierten Genen bei der SSc zählen IRF5 (Interferon regulierender Faktor) und IRF8 (41, 42). Bei über 800 SSc-Patienten konnte eine Korrelation mit dem IRF5 Intro 1 rs2004640 T Allel und dem diffusen Subtyp der SSc nachgewiesen werden (43).

Zusätzlich zu den genannten Loci sind weitere Gene, deren Funktion in der Pathogenese der Sklerodermie nicht abschließend erforscht ist, bekannt. Dazu gehören TNIP1, das an der Aktivierung des NF- κ -B-Signalweges beteiligt ist, sowie (34) der Transkriptionsfaktor SOX5 (engl. *sex determining region Y-box 5*), der mit über das Zellschicksal entscheidet und

eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Chondrozyten spielt (42, 44). Bei der Zelldifferenzierung und -morphogenese zeigt sich, dass NOTCH4 (engl. *Neurogenic locus notch homolog 4*) und RHOB (engl. *Ras homolog gene family member B*) mit der Sklerodermie assoziiert sind (34, 42). NOTCH4 erfüllt als Rezeptorprotein eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. RHOB hingegen reguliert ausschließlich die Zellmorphogenese und Motilität. Es konnte eine deutliche Korrelation zwischen NOTCH4 und der Präsenz von ANA sowie Anti-Zentromer-Antikörpern (ACA) nachgewiesen werden, während bei RHOB die Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) rs342070 und rs13021401 deutlich unspezifischer mit der SSc korrelieren.

Diese, hier kurz und nicht umfassend dargestellten, genetischen Prädispositionen sollen verdeutlichen, dass bei der Pathogenese der Sklerodermie – wahrscheinlich nach einem exogen-entzündlichen Auslöser – ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlichster genetischer Faktoren vorliegt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist eine umfassende Bewertung der einzelnen genetischen Veränderungen bei der Sklerodermie aufgrund der unterschiedlichen SSc-Kohorten und Studiengestaltungen schwierig.

3.2.3. Immunologischer Hintergrund

Das Immunsystem wird unterteilt in die adaptive und die angeborene Immunantwort. Diese Unterteilung beruht auf den beteiligten Zelltypen und der Aktionsweise. Während das angeborene Immunsystem der schnellen, unspezifischen Abwehr von Pathogenen dient, ist das erworbene (adaptive) Immunsystem auf die gezielte Eliminierung von durch hochspezifische Antigene definierte Krankheitserreger spezialisiert. Beide Systeme arbeiten dabei nicht unabhängig voneinander, sondern ergänzen sich.

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen, Granulozyten (eosinophil, neutrophil und basophil), Mastzellen, dendritische Zellen (DC) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zelltypen exprimieren Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptor*, PRR) mit deren Hilfe sie Pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen. Zu diesen Mustern zählen die Pathogen-assoziierten Muster (engl. *pathogen associated pattern*, PAMP), als auch die Mikroben-spezifischen (engl. *microbe associated pattern*, MAMP) und die Gefahr-spezifischen (engl. *damage associated pattern*, DAMP). Wird ein solches Muster erkannt, erfolgt die Aktivierung der Immunzelle. Je nach Reaktion des Immunsystems kann u. a. eine Sekretion unterschiedlicher Zytokine, eine verstärkten Endozytose und NADPH-Oxidaseaktivität

sowie eine erhöhte Expression von ko-stimulierenden Membranantigenen und MHC-Zelloberflächenmolekülen auftreten. Die Gruppe der PPR besteht aus Oberflächen- und intrazellulären Rezeptoren. Letztere werden zytoplasmatisch oder intern im Endosom exprimiert. Auf der Zelloberfläche findet man als PPRs bestimmte Toll-ähnliche Rezeptoren (engl. *toll like receptors*, TLR) und die C-Typ-Lektinrezeptoren (CLR). Intrazellulär werden RNA- und DNA-erkennende TLR3, TLR7/8 und TLR9, sowie die RIG-1-ähnlichen Rezeptoren (RLR) und die NOD-ähnlichen Rezeptoren (NLR) exprimiert. Das angeborene Immunsystem kann auf keine neuen, veränderten Pathogene reagieren, da es ausschließlich genetisch fixierte Muster (PAMP, MAMP, DAMP) erkennt (45).

Das adaptive Immunsystem hingegen kann spezifische, veränderte Pathogenbestandteile mit hoher Spezifität identifizieren. Zu den Zelltypen des erworbenen Immunsystems gehören T-Helferzellen, B- und T-Lymphozyten sowie zytotoxischen T-Lymphozyten. Das adaptive Immunsystem wird unterteilt in die zellvermittelte Immunantwort (z. B. Th1, Th2, Th17, regulatorische Z-Zellen und CD8-positive Zellen) und die humorale Immunität (Antikörper verschiedener Immunglobulinklassen der B-Lymphozyten im Zusammenspiel mit T-Helferzellen) (siehe Abbildung 2) (46).

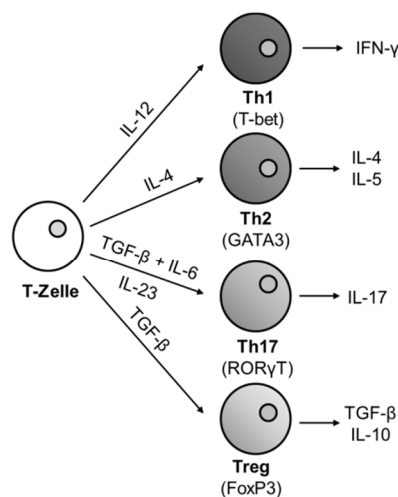


Abbildung 2: Schematischer Überblick über T-Zelldifferenzierung. Die Vorläufer-T-Zelle differenziert sich nach der Aktivierung abhängig von dem lokal vorhandenen Zytokinmilieu. Bisher sind 4 T-Helferzell-Subpopulationen beschrieben: Th1, Th2, Th17 und Treg (regulatorische T-Helferzellen). Jeweils in Klammern sind die charakteristischen Zelloberflächenmarker genannt (T-bet, GATA3, RORγT, FoxP3). Jede Subpopulation exprimiert und sezerniert spezifische Zytokine, z. B. Th1-Zellen sezernieren Interferon-γ (IFN-γ). IL, Interleukin; TGF, Tumornekrosefaktor (adaptiert von Maniati et al., *Oncogene*, 2010, modifiziert nach Florian Ottenlinger).

An der zellvermittelten Antwort sind antigenpräsentierende Zellen, APC, Makrophagen und T-Lymphozyten beteiligt. Sie aktivieren die Produktion und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-(IL)-2 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Nach Ausbildung von Effektor-T-Lymphozyten sezernieren diese eine Vielzahl von Proteinen, u. a. Makrophagen-aktivierende Zytokine. So sind z. B. durch IFN- γ aktivierte Makrophagen effizienter in der Phagozytose von Mikroben und zerstören diese im sauren Lysosom durch Sauerstoffradikale und Enzyme. Die Th1-Immunantwort findet man vor allem bei durch Viren, Mykobakterien oder Pilze verursachten Infekten und bei Tumoren. Die humorale Immunität basiert auf der Stimulation von B-Lymphozyten und der daraus resultierenden Antikörper-Produktion und -Freisetzung. Spezifisch für die B-Zell-stimulierende Th2-Antwort sind die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Besonders bei extrazellulär parasitären und bakteriellen Erkrankungen ist die Th2-Immunantwort von Bedeutung. Im Gegensatz zu dem angeborenen Immunsystem kann das adaptive System ein immunologisches Gedächtnis entwickeln. Dabei differenziert sich aus den T-Lymphozyten eine Subpopulation (die sogenannten T-Gedächtniszellen). Diese bleibt auch nach Ende der Infektion erhalten und kann bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen wesentlich schneller eine Immunantwort hervorrufen (45).

Neuere Untersuchungen konnten die Existenz einer weiteren T-Lymphozyten-Zelllinie, die Th17-Zellen, nachweisen. Diese Zellen sind - zusätzlich zu den Th1 Zellen - mit der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, z. B. der rheumatoiden Arthritis oder der multiplen Sklerose, assoziiert (47). Die bei der Pathogenese aktivierten Th17-Zellen sezernieren eine Vielzahl an pro-inflammatorischen Zytokinen: IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 und IL-23. Diese Th17-Zytokine wirken auf Fibroblasten, Epithel- sowie Endothelzellen (48) und bewirken eine erhöhte Produktion von Zytokinen, Chemokinen und teilweise auch Metalloproteasen. Die Th17-Immunreaktion stellt eine eigenständige Antwort des Immunsystems mit dem Fokus auf den Krankheitsverlauf von Autoimmunerkrankungen dar. Bei SSc-Patienten kann ein erhöhter IL-17-Spiegel sowohl im Blut als auch in fibrotisch veränderten Biopsien der Haut und der Lunge nachgewiesen werden (49, 50). Ebenso kann eine erhöhte Th17-Zellpopulation in Sklerodermie-Patienten als auch ein antifibrotischer Effekt von IL-17A auf die Expression von Kollagen 1 als auch CTGF (engl. connective tissue growth factor, Bindegewebswachstumsfaktor) auftreten (51, 50). Die Th17-Zellen und deren Zytokine scheinen ein nicht zu vernachlässigender Faktor in der Entstehung der Sklerodermie zu sein.

Immunologisch betrachtet, ist die Sklerodermie bisher nicht eindeutig der angeborenen oder der adaptiven Immunantwort zuzuordnen. Es wird vermutet, dass beide Systeme an der Pathogenese der systemischen Sklerose beteiligt sind. Bezüglich der adaptiven Immunantwort wird widersprüchlich diskutiert inwieweit die Th1- und die Th2-Immunantwort Einfluss auf die Pathogenese der Sklerodermie haben. So kommen in der frühen Phase der SSc auffällig viele IL-4 produzierenden T-Lymphozyten in der Haut vor (52). Dem entgegengesetzt konnten Valentini *et al.* (53) sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Aktivierung im peripheren Blut von SSc-Patienten entdecken. Andere Studien konnten eine geringe Dominanz von Th1-Zytokinproduzierenden Zellen, jedoch kein Ungleichgewicht der T-Lymphozyten in peripherem Blut von Sklerodermie-Patienten zeigen (54).

3.3. Klinisches Erscheinungsbild

3.3.1. Haut

Im klinischen Erscheinungsbild ist die Dermatofibrose charakteristisch für die systemische Sklerose. Zu Beginn geht sie häufig einher mit einer ödematösen Schwellung der Finger, den sogenannten *puffy fingers* (Abbildung 3). Bei vielen Patienten treten Morgensteifigkeit, Gelenkschmerzen und Spannungsgefühle der Haut auf. Bei Patienten mit Hautödemen zeigt sich eine beginnende Fibrosierung der Haut. Während die Hautödeme zu Anfang eingedrückt werden können, kommt es bei dem Fortbestehen des ödematösen Zustandes zu einer vermehrten Ablagerung von Glykosaminoglykanen im extrazellulären Bereich. Die daraus resultierenden Verdickung und Verhärtung der Haut führt vielfach zu einer weiteren Bewegungseinschränkung der Finger und zur Ausbildung der sogenannten Krallenhand (Abbildung 3).

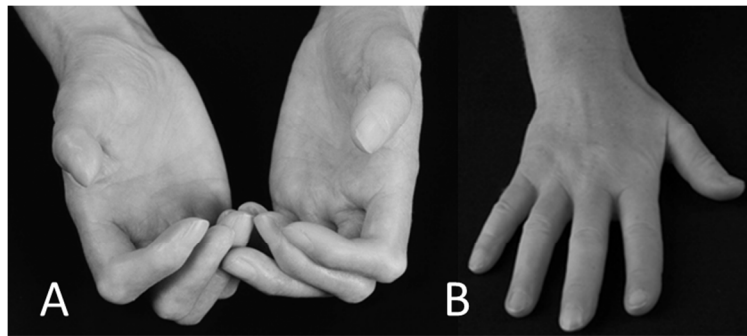


Abbildung 3: A) Ausbildung der Krallenhand nach eingesetzter Fibrosierung der Finger bei einem SSc-Patienten. Gut sichtbar ist die glatte, gespannte Haut der Finger als Resultat der Hautstraffung und -verdickung. B) Diffuses Sklerödem der Finger eines SSc-Patienten. (modifiziert nach (55)).

Beginnt die Verhärtung der Haut im Gesicht, treten periorale, sternförmige Hautfältelungen, die einen maskenhaften Gesichtsausdruck mit reduzierter Mimik auslösen, auf. Initial wegweisend ist meist eine Fibrose des Zungenbändchens sowie die Mikrostomie, eine Verkleinerung der Mundöffnung meist mit auf die Lippen zulaufenden Hautfalten (Tabakbeutelmund). Diese schränkt die Nahrungsaufnahme und Mundhygiene ein. Gleichzeitig wird die progrediente Zurückbildung der Mundschleimhaut beschleunigt. Daraus resultieren Zahnfleischwund und Zahnausfall (56). Bei bis zu einem Viertel aller Sklerodermie-Patienten treten darüber hinaus Ablagerungen präzipitierter Kalziumsalze in der Dermis und der Subkutis auf (Calcinosis cutis) (57). Die Kalziumsalze bestehen hauptsächlich aus amorphem Kalziumphosphat und geringe Mengen an Kalziumkarbonat. Oftmals sind nicht nur die Finger, sondern auch Hände und Unterarme betroffen. Zusätzlich können weitere Lokalisationen (z.B. Stamm, Knie, Beine) betroffen sein. Die Kalziumablagerungen können die Haut durchbrechen und zu einer sekundären Infektion führen, die bei der für die Erkrankung charakteristischen herabgesetzten Durchblutung schlecht abheilen. Die Lebensqualität der Patienten ist durch das Auftreten von Bewegungseinschränkungen, Schmerzen und von, durch die Hautfibrose verursachten, Veränderungen des Erscheinungsbildes deutlich herabgesetzt.

3.3.2. Raynaud-Phänomen und Blutgefäßsystem

Das Raynaud-Phänomen beschreibt eine Durchblutungsstörung der Akren. Dabei handelt es sich um episodische, schmerzhafte Vasospasmen der Arteriolen in Fingern und/oder Zehen. Auslöser der fehlerhaften Vasokonstriktionen können Kälte, Vibration oder

emotionaler Stress sein (58). Das Krankheitsbild geht einher mit Kribbeln in den Fingern (oder Zehen) und gleichzeitiger Verfärbung der Hautoberfläche. Diese Verfärbung beginnt mit einem Erblassen der Finger. Anschließend kommt es zu einer Blaufärbung der betroffenen Hautareale, welcher sich eine Rotfärbung anschließt. Das Erblassen der Haut, die sogenannte Weißfärbung, resultiert aus einer Minderdurchblutung des betroffenen Gewebes. Hält die Minderdurchblutung für mehrere Minuten an, führt der Sauerstoffmangel im umliegenden Gewebe zu einer bläulichen Verfärbung der Finger. Das von den Patienten beschriebene, teilweise schmerzhafte Kribbeln der Finger, beruht auf der Wiederdurchblutung der Finger und läuft parallel zu der Rotfärbung ab. Dieser Vorgang der Re-Oxygenierung ist mit einer gesteigerten Bildung von Sauerstoffradikalen verbunden. Einhergehend mit der mangelhaften Durchblutung der distalen Fingerglieder, kommt es zu einer lokal begrenzten, verschlechterten Wundheilung. Kleine, neu auftretende Wunden resultieren vielfach in Ulzerationen der Fingerkuppen. Diese können bei einem schlechten Verlauf oder unzureichender Medikation bzw. Pflege zu einem progredienten, akralen Substanzverlust und bakterielle Superinfektion führen. Bei über 90 % der Sklerodermie-Patienten zeigt in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung das Raynaud-Phänomen. Hierbei wird das primäre Raynaud-Syndrom, eine rein funktionelle Durchblutungsstörung, von dem sekundären Raynaud-Phänomen, das durch eine zugrunde liegende Erkrankung (z.B. systemischer Lupus erythematodes) bedingt ist, unterschieden (59). Das sekundäre Raynaud-Phänomen geht einher mit pathologischen Veränderungen in der Kapillarstruktur im Nagelfalz. Zu diesen Veränderungen zählen vergrößerte Kapillaren (Megakapillaren), Verringerung der Kapillardichte, Mikrohämorrhagien, beginnende Neovaskularisierung und veränderte Kapillaren (torquierte Kapillare, Büschelkapillaren). Nach Cutolo (60) unterteilt die Kapillarveränderungen in drei Stadien: früh, aktiv und spät (Abbildung 4). Im frühen Stadium treten Scheitelektasien und einzelne Megakapillare in der distalen Reihe der Nagelfalzkapillare auf. Die Kapillardichte ist annähernd normal (≥ 10 Kapillare/Millimeter) und entspricht ca. 8-9 Kapillaren pro Millimeter. Selten sind bereits in diesem frühen Stadium erste Einblutungen zu sehen. In der zweiten, aktiven Phase kommt es dann zu einer erhöhten Anzahl an Megakapillaren und vermehrten Einblutungen, welche mit zunehmendem Kapillarverlust einhergehen. Diese avaskulären Areale vernarben und führen im späten Stadium zu einem Anstieg der Büschelkapillare. Erstmals treten neue Verzweigungen bereits bestehender Kapillare auf (Neovaskularisierung). Sowohl die Neovaskularisierung als auch die Ausbildung von Büschelkapillaren geschieht, um das mit Sauerstoff minderversorgte Gewebe in den Fingern besser zu versorgen.

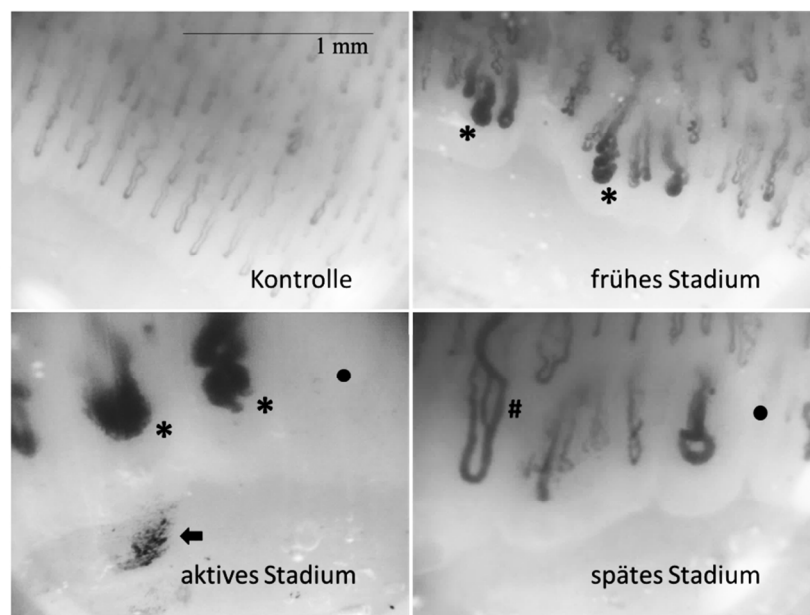


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der Stadien des sekundären Raynaud-Phänomens im Vergleich zu der Kapillararchitektur eines gesunden Individuums per Kapillarmikroskopie (Vergrößerung 200-fach). Links oben: Kapillarstruktur eines gesunden Probanden mit gleichmäßig verteilten Kapillaren. Rechts oben: Frühes Stadium der Kapillarveränderungen in dem Nagelfalz eines Patienten mit lcSSc. Sterne kennzeichnen Megakapillare. Links unten: Aktives Stadium des sekundären Raynaud-Phänomens. Sterne kennzeichnen Megakapillare, Pfeile Mikrohämorrhagien und Punkte beginnende avaskuläre Bereiche. Rechts unten: Spätes Stadium, typisch für dcSSc-Patienten. Punkte markieren avaskuläre Gebiete, Rauten markieren Neovaskularisierung.

Im späteren Verlauf der systemischen Sklerose können neben den Kapillaren weitere Blutgefäße der Finger betroffen sein. Dies zeigt sich in der Bildung von Teleangiektasien. Dabei handelt es sich um makroskopisch erkennbar erweiterte Blutgefäße der Haut. Betroffen sind Gesicht, Finger, Lippen und Mundschleimhaut (61).

3.3.3. Gastrointestinaltrakt

In der Sklerodermie ist die häufigste systemische Manifestation die des Gastrointestinaltrakts (GI-Trakt). Bei über 94 % der Sklerodermie-Patienten sind der obere und bei 79 % der untere GI-Trakt betroffen (62). Die Patienten leiden überwiegend an einer Refluxösophagitis. Diese resultiert aus einer Atrophie der glatten Muskulatur der unteren zwei Drittel des Ösophagus. Ursachen dafür sind die Fibrosierung der *Lamina muscularis*, der *Submukosa* sowie der *Lamina propria* und einer reduzierten Funktion des Ösophagussphinkter (63). Zugleich ist oft die Motilität des Magens beeinträchtigt.

Zusätzlich klagen Patienten über Atonie, Emesis und Nausea. Wenn Dünn- und Dickdarms beteiligt sind, können Diarrhö, Obstruktion, bzw. Pseudoobstruktion, oder bakterieller Fehlbesiedelung auftreten. Hält die Funktionseinschränkung des Dickdarms länger an, kann dies zur Verringerung des Analsphinktertonus bis zu Stuhlinkontinenz führen. Bei rund 20 % der SSc-Patienten verursacht eine Beteiligung des GI-Trakts eine Malabsorption, welche zu einer Mangelversorgung des Organismus führt (64). Häufig tritt bei diesen Patienten ein deutlicher Gewichtsverlust auf.

3.3.4. Lunge

Zu den pulmonalen Manifestationen zählen die interstitielle Lungenerkrankung (engl. *interstitial lung disease*, ILD) und die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH). Die ILD wird charakterisiert durch Dyspnoe und einen nicht-produktiven Husten. Zurückzuführen ist dies auf eine Fibrosierung des Lungenparenchyms, welche bei voranschreitender ILD eine Verringerung des Lungenvolumens zur Folge hat. Mit zunehmender Lungenfibrose können sich erste Symptome einer Rechts-Herzinsuffizienz zeigen (z. B. Verringerung der rechtsventrikulären Pumpfunktion). Diese führt zu einer sekundären PAH. Hauptsymptome der idiopathischen und sekundären PAH sind ein nicht-produktiver Husten und ein Pulmonalarteriendruck in Ruhe von > 25 mm Hg. Des Weiteren kann ein akzentuierter zweiter Herzton auftreten. Ursache des erhöhten Drucks der Pulmonalarterie sind der zunehmende Umfang der Gefäßmuskulatur und deren irreversibler Umbau in Bindegewebe. Bei bis zu 90 % der SSc-Patienten kann eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion nachgewiesen werden. Die Lungenbeeinträchtigung ist die häufigste Todesursache bei der systemischen Sklerose. Bei einer vorliegenden PAH beträgt die Fünfjahresüberlebensrate weniger als 10 % (65–67).

3.3.5. Bewegungsapparat

Bei bis zu 50 % der Patienten mit systemischer Sklerose werden Arthralgien diagnostiziert. Die Mehrzahl der Patienten berichtet von einer allgemeinen Morgensteifigkeit und einer proximalen Muskelschwäche. Bei 5 % bis 20 % der Patienten sind Zeichen einer Arthritis feststellbar. Aufgrund der Entzündungen reduziert sich die Beweglichkeit der Extremitäten. Es kommt zu tastbarem Sehnenreiben in den Sehnenscheiden der Beuge- und Strecksehnen der Hände und Füße (55, 63, 68).

3.3.6. Weitere Organmanifestationen

Weitere Manifestationen betreffen Nieren, Herz und exokrinen Drüsen. Bei den Nieren kann es zu Niereninsuffizienz, renaler Hypertonie, Proteinurie und Erythrozyturie kommen. Bei 20 % der Fälle können diese Symptome schwerwiegend sein. Nierenversagen im Rahmen der SSc, ist rasch progredient und wird oftmals verursacht durch eine Ischämie oder einen Niereninfarkt. Selten, und als ein Zeichen schlechter Prognose, treten renale Krisen auf.

In unterschiedlichen Studien wird die Prävalenz der Herzbeteiligung auf 15 bis 35 % geschätzt (69, 70). Sie manifestiert sich als Perikarditis, Herzinsuffizienz oder Ischämie. Ferner kann es aufgrund einer fibrotischen Gefäßverengung zu einem Infarkt kommen. Neben der Beteiligung der Lunge zählt die Herzmanifestation zu einer der häufigsten Sklerodermie-abhängigen Todesursachen bei SSc-Patienten (71).

3.4. Klassifizierung der Sklerodermie

Die Sklerodermie wird in folgende Subtypen unterteilt:

- Morphea ohne systemische Manifestation
- auf die Haut limitierte systemische Sklerose (lcSSc),
- diffuse systemische Sklerose (dcSSc)
- systemische Sklerose ohne Hautbeteiligung (<1%) (72).
- undifferenzierte Sklerodermie (etwa 8%)
- Overlap-Syndrom (etwa 11%)

Die systemische Sklerose ohne Hautbeteiligung (engl. *scleroderma sine scleroderma*) kommt bei weniger als 10% aller SSc-Patienten vor (57, 73, 74). Sie ist gekennzeichnet durch den charakteristischen fibrotischen Umbau der ECM der inneren Organe, das Raynaud-Phänomen und das Fehlen einer Dermatofibrose. Aufgrund der geringen Prävalenz wird die *Scleroderma sine scleroderma* nicht weiter ausgeführt.

Die definierte Unterteilung in limitierte und diffuse Sklerose wurde anfänglich von LeRoy (1988) mit Hilfe eines internationalen Konsensus festgehalten (17). Nachfolgenden werden die Unterschiede der beiden am häufigsten vorkommenden Subtypen detailliert beschrieben.

3.4.1. Limitierte systemische Sklerose

Die limitierte systemische Sklerose (lcSSc) betrifft ca. 54 bis 72 % der Sklerodermie-Patienten und stellt die häufigere, wenn zugleich die mildere Verlaufsform der SSc dar (10, 75, 76). Charakteristisch für die lcSSc ist eine Hautbeteiligung, die sich distal der Ellenbogen und Kniegelenke manifestiert und das Gesicht betrifft (17, 77). Die Fibrose der Haut verläuft langsam progredient und kann dennoch bei einigen Patienten über die Dauer von mehreren Jahren stabil bleiben. Eine pulmonale-arterielle Hypertonie kann oftmals erst im späteren Krankheitsverlauf auftreten, dann jedoch in einer progredienten und schweren Form (Abbildung 5). Im Vergleich zur diffusen Form zeichnet sich die lcSSc durch eine geringe Verdickung der Haut aus (Abbildung 5).

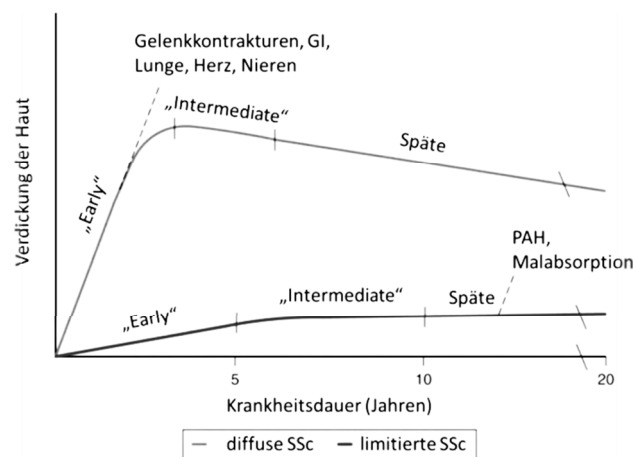


Abbildung 5: Krankheitsverlauf der limitierten SSc im Vergleich zur diffusen SSc (Modifiziert nach Clements PJ, Furst DE (eds): Systemic Sclerosis, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, S. 17 - 28.). Die diffuse SSc unterscheidet sich von der lcSSc durch eine früh einsetzende und stark fortschreitende Dermatofibrose. Bei der lcSSc ergibt sich ein langsamerer Krankheitsverlauf mit erst spät auftretender Organbeteiligung (Lunge, Herz). GI, Gastrointestinaltrakt; PAH, pulmonal-arterielle Hypertonie.

Zu Beginn der Erkrankung tritt bei über 90 % der lcSSc-Patienten das sekundäre Raynaud-Phänomen mit vaskulären Veränderungen im Nagelfalz auf (siehe Kapitel 3.3.2.). Zusätzlich können sich *Calcinosis cutis* in der Haut und Teleangiektasien im Gesicht ausbilden (CREST-Syndrom). Die limitierte Form der systemischen Sklerose lässt sich anhand nachweisbarer Autoantikörper von der diffusen Form unterscheiden. Neuere Studien zeigen, dass in 20 bis 50 % der Fälle lcSSc-Patienten Anti-Zentromere Antikörper (engl. *anticentromere antibodies*, ACA) aufweisen (78), während diese bei der dcSSc bei weniger als 10 % der Patienten nachweisbar sind (79).

3.4.2. Diffuse systemische Sklerose

Bei der dcSSc handelt es sich um die schwerere Verlaufsform der systemischen Sklerodermie. Diese tritt in 23 bis 35 % der Fälle auf (10, 75, 76). Sie zeichnet sich durch eine Dermatofibrose des Stammes und das frühe Auftreten des Raynaud-Phänomens vor der Organbeteiligung aus (Abbildung 5) (72). Zusätzlich lassen sich frühzeitig Veränderungen in der Kapillararchitektur und ein Abrieb der Sehnen feststellen. Im Gegensatz zu der lcSSc findet sich ein geringer bis fehlender ACA-Titer; dafür sind bei über der Hälfte der dcSSc-Patienten Anti-Topoisomerase Antikörper nachweisbar (78). Die dcSSc unterscheidet sich maßgeblich in der Mortalität von der lcSSc. Nach der Diagnosestellung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für die lcSSc bei 90,9 %, während sie für Patienten mit dcSSc 69,5 % deutlich herab gesetzt ist (15).

3.5. Diagnostik der systemischen Sklerose

Die Klassifikation der Sklerodermie beruht hauptsächlich auf den Kriterien der ACR (engl. *American College of Rheumatology*) von 1980 (80). Diese Kriterien setzten sich zusammen aus einem Haupt- und drei Nebenkriterien:

- Hauptkriterium: Dermatofibrose proximal der Fingergrundgelenke
- Nebenkriterium:
 - a. Beidseitige basale Lungenfibrose
 - b. Sklerodaktylie
 - c. digitale Ischämie

Es müssen entweder das Hauptkriterium oder zwei der drei Nebenkriterien erfüllt sein. Aufgrund der hohen „Unschärfe“ und Variation in der Diagnosestellung von Arzt zu Arzt (siehe Variationen in der Inzidenz 3.2) werden für aktuelle Studien die verbesserten ACR/EULAR-Kriterien von 2013 verwendet (81). Diese erfassen auch Frühformen der SSc. Dabei handelt es sich um einen Kriterienkatalog, bei dem einzelnen Kriterien unterschiedlich gewichtet wurden. Ergibt sich in der Summe ein Score größer als neun Punkte, ist der Patient als SSc-Patient klassifiziert. Die einzelnen Kriterien sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Die ACR/EULAR-Kriterien (2013) zur Klassifizierung von definitiver systemischer Sklerose und deren Gewichtung

Gegenstand	Untergeordnete Kriterien		Gewichtung/Score	
Proximale Sklerodermie	-		9	
Hautverdickung der Finger	a)	<i>Puffy fingers</i>	a)	2
	b)	Sklerodaktylie der Finger	b)	4
			(gewichtet wird der höhere Score)	
Läsionen der Fingerspitzen	a)	digitale Ulzerationen	a)	2
	b)	Rattenbissnekrosen	b)	3
			(gewichtet wird der höhere Score)	
Teleangiektasie	-		2	
Abnormale Nagelfalzkapillaren	-		2	
Beteiligung der Lunge	a)	PAH	a)	2
	b)	ILD	b)	2
			(max. 2)	
Raynauds Phänomen	-		3	
SSc-assoziierte Auto-Antikörper	a)	Anti-Zentromer	3	
	b)	Anti-Topoisomerase I	(max. 3)	
	c)	Anti-RNA-Polymerase III		

ILD, interstitielle Lungenerkrankung; PAH, pulmonal-arterielle Hypertonie

Zusätzlich zu der Klassifikation mit Hilfe der ACR-Kriterien, werden diagnostische Parameter erhoben, um die Schwere der Erkrankung zu erfassen. Dabei werden folgende Laborparameter erhoben: Entzündungsparameter, darunter Blutsenkung (BSG), C-reaktives Protein (CRP) und Akute-Phase-Proteine (Komplementfaktoren, C3, C4) sowie Autoantikörper (siehe 3.5.2). Bei Einschränkungen von Herz, und Lungen wird deren

Funktion einmal jährlich mittels Echokardiographie (zum Ausschluss und Kontrolle einer pulmonalen Hypertonie) und Lungenfunktionstest mit CO-Diffusionskapazität (zum Ausschluss und Kontrolle einer erniedrigten Diffusionskapazität) überprüft. Routinemäßig sollte eine Kapillarmikroskopie durchgeführt werden, besonders zur Diagnosesicherung und zur Beurteilung der Hautbeteiligung der modifizierte Rodnan Haut Score (engl. *modified Rodnan skin score*; mRSS) erfasst werden. Die Erhebung des mRSS und die Prävalenz der Auto-Antikörper werden nachfolgenden detaillierter erläutert: 3.5.1 und 3.5.2. Neuere Publikationen zeigen, dass eine Frühdiagnose der systemischen Sklerodermie mit Hilfe von Kapillarmikroskopie und Erhebung des Antikörperstatus bei Auftreten von initialen Symptomen wie Raynaud-Phänomen möglich ist (82, 83). Weitere Biomarker für die Frühdiagnose stehen bisher nicht zur Verfügung.

3.5.1. Modifizierter Rodnan-Hautscore

Der mRSS erfasst die Verdickung der Haut. Er basiert auf dem von Rodnan 1979 entwickelten Hautscore (84). Dafür werden siebzehn verschiedene Hautareale palpiert und die Abhebbarkeit der Haut in die Grade 0 bis 3 eingeteilt. Grad 0 stellt eine normale Abhebbarkeit der Haut dar. Bei leichter Verdickung wird das Hautareal mit Grad 1 versehen. Mäßige bzw. starke Hautverdickungen werden mit Grad 2 und Grad 3 angegeben (detaillierte Darstellung siehe Abbildung 6). Die Werte der einzelnen Hautareale werden addiert und zur Beurteilung des Schweregrads der Dermatofibrose hinzugezogen. Der mRSS kann dabei eine Spannweite von 0 bis 51 Punkten aufweisen.

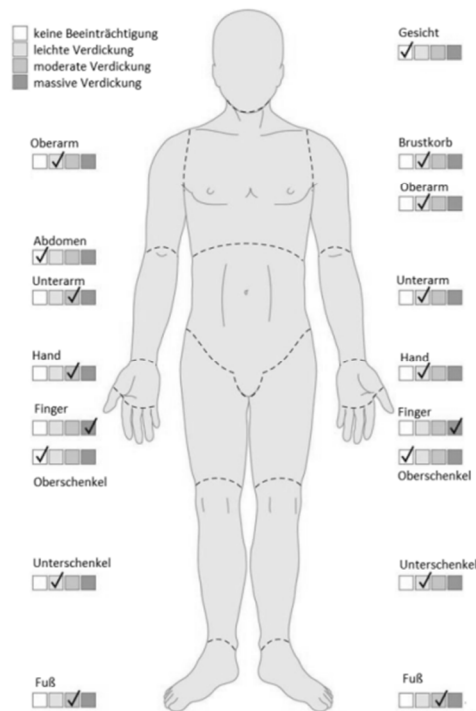


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Erhebung des mRSS (verändert nach (85)). Abgebildet sind alle zu bewertenden siebzehn Hautareale inklusive der beispielhaften Gesamtwertung von 21.

3.5.2. Autoantikörper

Autoantikörper richten sich gegen körpereigene Antigene. Sie sind Anzeichen für den Zusammenbruch der immunologischen Toleranz. Hierbei unterscheidet man die zentrale von der peripheren Toleranz. Der Zusammenbruch der zentralen Toleranz führt im Thymus und Knochenmark zu einer unvollständigen negativen Selektion von T- bzw. B-Lymphozyten mit hochaffinen Rezeptoren für Autoantigene. In der Peripherie des Körpers verhindert eine Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten die Entstehung einer Autoimmunität. Dies wird durch unterschiedliche Selektionsmechanismen bezüglich der Lymphozyten gewährleistet: Apoptose, aktive Inhibition oder Induktion von Anergie. Die Effektorfunktion der Lymphozyten ist nicht mehr gegeben. Die Sekretion von Autoantikörpern und pro-inflammatorischen Zytokinen unterbleibt. Diese von den Lymphozyten sekretierten Autoantikörper sind an sich nicht immunogen. Die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung setzen weitere Störungen in den physiologischen Toleranzmechanismen voraus. Obwohl Autoantikörper in den meisten Sklerodermie-Patienten nachweisbar sind, lässt dies keine Aussage über ihre pathologische Bedeutung zu. Zur Bewertung und Einordnung des Antikörper-Befundes sind die Klinik des Patienten sowie die Ergebnisse des Organscreenings und der Kapillarmikroskopie entscheidend.

Bei über 90 % der Patienten sind Anti-Nukleäre Antikörper (ANA) im Serum nachweisbar (78). Unter den ANA wird eine Gruppe von Autoantikörpern zusammengefasst, die gegen unterschiedliche Strukturen im Zellkern gerichtet sind. Sie können jedoch in das Zytoplasma translozieren und sich zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus an die Chromosomen binden. Für die meisten ANA ist keine pathologische Relevanz bekannt. Wie die meisten Autoantikörper können ANA per indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Bei hohen Titern > 1:320 ist das Vorliegen einer immun-vermittelten Systemerkrankung wahrscheinlich. Zu den wichtigsten, definierten ANA zählen Anti-Scl-70 (Anti-Topoisomerase I), Anti-Zentromer (Anti-CENP-B), Anti-RNA-Polymerase und Anti-Fibrillarin (U3 snRNP). Je nach Subtyp der Erkrankung treten unterschiedliche Auto-Antikörpermuster auf (Tabelle 3).

Tabelle 3: Antikörper-Diagnostik bei systemischer Sklerose (modifiziert nach (6))

Antikörper	Häufigkeit	Assoziation/Subform
Anti-Scl-70	40 %	dcSSc, frühe viszerale Beteiligung
Anti-CENP-B	20 – 50 %	lcSSc, assoziiert mit Raynaud Phänomen, Teleangiektasie, Lungenbeteiligung
Anti-RNA-Polymerase	5 – 20 %	dcSSc, Nierenbeteiligung, schlechte Prognose
U3 snRNP	2 – 5 %	Muskelbeteiligung, PAH
Anti-Th (To)	5 – 10 %	lcSSc

PAH, pulmonal-arterielle Hypertonie; lcSSc, auf die Haut limitierte SSc, dcSSc, diffuse SSc

3.6. Therapie und Rehabilitation

Die Therapie der systemischen Sklerose ist symptom-orientiert. Eine kurative Therapie steht aktuell nicht zur Verfügung. Medikamentöse Behandlungsstrategien umfassen unter anderem die Linderung von Schmerzen (durch Analgetika, NSAR), die Verbesserung der Durchblutung durch Vasodilatation (z.B. durch Sildenafil, Bosentan, Ilomedin), sowie die anti-inflammatorische Therapie mit Immunsuppressiva (z.B. Methotrexat, Ciclosporin, Cyclophosphamide, Azathioprin, D-Penicillamin, Prednison (in seltenen Fällen mit

Colchicin) (6). Bei der Durchführung einer immunsuppressiven Therapie wird davon ausgegangen, dass die vorliegende Autoimmunreaktion zu einer Inflammation führen könnte. Unbehandelt können diese Entzündungen zu weiteren Organschädigungen und Fibrose führen. Hierbei wird die Fibrose als „Nebenprodukt“ der pro-inflammatorischen Reaktion begriffen (85).

Bei der Gabe von Methotrexat konnte ein positiver Effekt auf die Haut- und Lungenbeteiligung in doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studien bei SSc-Patienten nachgewiesen werden (Evidenz Grad A) (86, 87). Für Cyclophosphamid konnte ebenfalls ein positiver Effekt auf die Hautfibrose, sowie auf die Lungenfibrose nachgewiesen werden (Evidenz Grad A) (6, 88–90).

Für die Behandlung der Vaskulopathie empfiehlt die EULAR (engl. *European League against Rheumatism*, Europäische Liga gegen Rheuma) Nifedipin, Iloprost und Bosentan. Nifedipin wirkt als Kalziumantagonist auf die glatten Muskelzellen der Gefäße und führt zu Gefäßerweiterungen. Eine ähnliche Wirkung weist Iloprost auf. Es zählt zu den stärksten Vasodilatoren, während es zusätzlich die Thrombozytenaggregation hemmt. Beide Vasodilatoren, Nifedipin und Iloprost, reduzieren die Häufigkeit, den Schweregrad des Raynaud-Phänomens und verbessern geringfügig die Entstehung neuer digitaler Ulzerationen (DU) bei SSc-Patienten (91–95). Zur Behandlung der Vaskulopathie bei SSc ist die Therapie mit Bosentan, einem dualen Endothelin-Rezeptorantagonist empfehlenswert (96). Es eignet sich nicht zur akuten Behandlung der Vaskulopathie, aber ist zur Prävention von DU bei Patienten mit diffuser SSc effektiv (Evidenz Grad A) (97, 98). Als erste Behandlungslinie bei DU empfiehlt die EULAR Nifedipin und bei unzureichender Effizienz Iloprost. Bosentan wird besonders bei dcSSc-Patienten mit wiederkehrender DU zur Rezidivprohylaxe empfohlen.

Abhängig von der Beeinträchtigung der Lunge werden zur Behandlung der pulmonal-arteriellen Hypertonie Bosentan, Sitaxentan und Sildenafil eingesetzt (99–101). Für besonders schwerwiegende Fälle der SSc-assoziierten PAH werden intravenöse Epoprostenol-Infusionen empfohlen (99). Eine weitere Beeinträchtigung der Lunge, die interstitielle Lungenerkrankung, wird systemisch mit Cyclophosphamid behandelt (88).

Die EULAR empfiehlt bei renaler Symptomatik den Einsatz von Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms. Die Behandlung von mit dem gastrointestinalen Trakt verknüpften Symptomen beschränkt sich auf den Einsatz von Protonenpumpen-Inhibitoren und Prokinetika, z. B. Cisaprid (96).

Zusätzlich zu der medikamentösen Therapie gibt es weitere nichtmedikamentöse Optionen, die eine entscheidende therapeutische Säule mit nachhaltigem Effekt auf Symptome und Lebensqualität der Patienten umfassen. Hierzu zählen Ergotherapie mit thermischer Anwendung und Schienenanpassung, Lymphdrainage und Krankengymnastik. Hier liegt der Fokus auf dem Erhalt der Beweglichkeit des bereits betroffenen Halte- und Bewegungsapparates, aber auch der Atmung sowie zur physikalischen Verbesserung der Vaskulopathie. Insgesamt bleibt festzustellen, dass die bisher eingesetzten therapeutischen und medikamentösen Maßnahmen zumeist nur Symptom-lindernd wirken oder im besten Falle zu einer verzögerten Progression der Sklerodermie führen.

3.7. Biomarker für die systemische Sklerose

Wie die ACR/EULAR-Kriterien von 2013 zeigen, sind, abgesehen von den Auto-Antikörpern und Kapillarmikroskopie als Bildgebung, keine Biomarker für die Frühdiagnose- und Verlaufskontrolle der SSc in Verwendung (81).

Die systemische Sklerose stellt ein seltenes Krankheitsbild mit erhöhter Mortalität dar, deren Therapie durch die Mannigfaltigkeit der Symptome ausschließlich symptom-orientiert erfolgt. Die Möglichkeit der frühen Diagnosestellung und Verlaufskontrolle mittels eines weiteren Biomarker hat einen hohen „*medical need*“ inne. Dies wird auch durch die vermehrten Publikationen zur Sklerodermie und zu potentiellen Biomarkern deutlich (102).

Da besonders im Anfangsstadium die klinisch präsenten Symptome fehlen, wären diagnostische Biomarker ein bedeutender Fortschritt für die frühe Detektion und Behandlung der Sklerodermie. Die Heterogenität der klinischen Präsentation und der serologischen Befunde der SSc-Patienten erschwert dabei die Suche nach neuen, diagnostischen Biomarkern. Ein oder eine Kombination von Biomarkern wäre dann optimal, wenn einerseits die Unterteilung zwischen leichter und schwerer Verlaufsform und zusätzlich eine Erfolgskontrolle der Therapie abgelesen werden könnte.

In den meisten Fällen beschränken sich die bisher diskutierten potentiellen Biomarker auf die Prognose einzelner SSc-assoziiierter Symptome. Dazu zählen Biomarker für die Dermatofibrose und die Herz- oder Lungenbeteiligung. Diese Marker zählen u. a. zu den Chemokinen, Zytokinen, Fragmenten der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP).

Für die Prädiktion der pulmonal-arteriellen Hypertonie konnte Allanore *et al.* starke Evidenzen vorweisen, dass sich NT-proBNP (Pro-Form des natriuretischen Peptids Typ B) für die Diagnose bei SSc-Patienten eignet (103).

Für die Fibrose der Haut wurden verschiedene Moleküle, darunter Antikörper und Peptide, analysiert. Dazu zählen TGF- β (Tumornekrosefaktor- β), CTGF, MMPs, TIMPs, der nicht kollagene ECM-Bestandteil COMP (engl. *cartilage oligomeric matrix protein*, oligomeres Knorpelmatrixprotein) und die Lysyl-Oxidase.

Sowohl für das, als pro-fibrotisch bekannte, TGF- β (19) als auch für CTGF (104) konnte eine erhöhte Serumkonzentration in SSc-Patienten nachgewiesen werden. Weiterhin konnten Sato *et al.* eine Korrelation zwischen dem CTGF-Serumspiegel und der Hautbeteiligung nachweisen. Ähnlich verhält es sich mit den MMPs, die als Kollagenasen wichtige für den fibrotischen Umbau des Gewebes sind. Sie spalten Moleküle der ECM und sorgen für ein Gleichgewicht im Auf- und Abbau der ECM. Bei der Form der Fibrose, bei der Abbau der ECM gestört ist, wurde bereits im frühen Krankheitsstadium die MMPs als potentielle Biomarker und therapeutische Targets in der SSc untersucht. Für die MMP-7, -9, -12 und -13 wurden ein Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration und dem Ausmaß der Hautfibrose bzw. der PAH gezeigt (105–108). Ebenso wurden die Inhibitoren der MMPs untersucht. TIMP-1 ist sowohl im Serum erhöht als auch in den zirkulierenden Monozyten von Sklerodermie-Patienten (107, 109).

Die Lysyl-Oxidase und COMP wurden in dieser Arbeit als Referenzmarker für die hier neu vorgeschlagenen Biomarker verwendet. Im nachfolgenden Kapitel erfolgt eine detaillierte Beschreibung.

3.7.1. Referenz-Biomarker für die Dermatofibrose

Um das Ausmaß der Dermatofibrose zu analysieren, werden in dieser Arbeit neben dem mRSS bereits publizierte, potentielle Biomarker als Referenzen verwendet. Dazu zählen die Lysyl-Oxidase und COMP.

Bei der Lysyl-Oxidase handelt es sich um ein extrazellulär vorliegendes Enzym, welches Kollagenfibrillen und Fibrin mittels Oxidation quervernetzt. Die daraus resultierende Stabilität der ECM stellt für den Verlauf der Hautfibrose ein großes Problem dar, zumal die ECM verlangsamer abgebaut wird und akkumuliert. Die Fibrose der Haut und der betroffenen Organe schreitet schneller voran, da es nicht nur zu einer Akkumulation der

ECM sondern auch zu einer stärkeren Quervernetzung kommt. Rimar *et al.* konnten erstmals eine erhöhte Lysyl-Oxidase-Serumkonzentration bei Sklerodermie-Patienten nachweisen (110). Bei SSc-Patienten ohne Lungenbeteiligung korrelierte die Lysyl-Oxidase-Konzentration zusätzlich mit der Hautbeteiligung, die mittels mRSS gemessen wurde.

Der zweite Referenz-Biomarker ist das nicht-kollagene Glykoprotein COMP (engl., *cartilage oligomeric matrix protein*). COMP ist im eigentlichen Sinne ein Marker für Gelenkknorpeldestruktionen (111), wird bei Knorpelschädigungen aus der ECM in die synoviale Flüssigkeit freigesetzt und gelangt danach in den Blutkreislauf. Dort kann es einfach detektiert werden. Ausgehend von diesem Prinzip untersuchten Hesselstrand *et al.* die COMP-Serumspiegel bei SSc-Patienten. Sie fanden heraus, dass COMP signifikant im Serum bzw. in der bronchoalveolären Lavage erhöht ist und mit dem Ausmaß der Haut- und Lungenfibrose korrelieren kann. Zusätzlich eignet sich COMP als prädiktive Maßeinheit für die Mortalität (112–114).

3.7.2. Potentielle Biomarker für die Diagnostizierung

Mit der vorliegenden Arbeit werden unterschiedliche Molekülgruppen als infrage kommende Biomarker untersucht. Den Hauptteil der Studie nimmt die Analyse der Sphingolipide ein. Zusätzlich wurden unterschiedliche Moleküle der Interleukin-33-(IL-33)/ST2-Signalkaskade bezüglich ihrer Eignung als diagnostische und/oder prädiktive Marker untersucht. Weiterhin befasste sich diese Studie mit dem Dickkopf-1 ähnlichen Protein (DKK-1), ein Inhibitor des Wnt-Signalweges, und seines Potential als Biomarker. Die analysierten Moleküle wurden anschließend bezüglich ihrer Veränderung im Verlauf der Erkrankung untersucht. Ebenso wurden der Sphingolipid- und der IL-33/ST2-Signalweg als, den Therapieerfolg verifizierende Quelle unter einer vasodilatorischen Medikation bei den SSc-Patienten untersucht. Um mögliche, weitere EC-spezifische Signalmoleküle in der Zirkulation der SSc-Patienten nicht zu übersehen, wurde eine Überprüfung von 102 Zytokinen exemplarisch in Serumproben von vier lcSSc-Patienten durchgeführt.

Ende des 19. Jahrhunderts benannte der Chemiker J. Ludwig L. Thudichum die Sphingolipide aufgrund ihres rätselhaften, „sphinx-ähnlichen“ Rückgrates „Sphingosin“ (115). Bei dem Sphingosin handelt es sich um einen einfach-ungesättigten Aminoalkohol. Zusammen mit einer Fettsäure, die über ihre Acylgruppe per Amidbindung mit dem Sphingosin verbunden ist, bildet es das Grundgerüst der Sphingolipide (siehe Abbildung 7). Man unterscheidet, abhängig von dem Molekül, das an den Fettsäurerest des Sphingosins gebunden ist, die drei Hauptgruppen: Ceramide, Sphingomyeline und Glycosphingolipide.

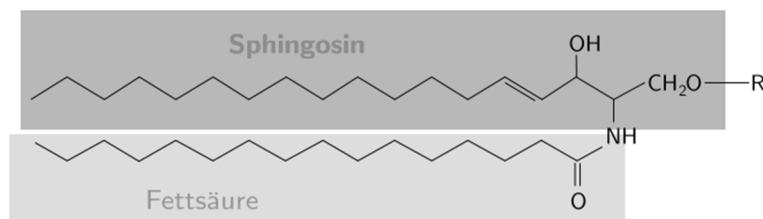


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Grundaufbaus der Sphingolipide hier am Beispiel des physiologisch relevanten N-(hexadecanoyl)-sphing-4-in (Abkürzung Cer(d18:1/16:0); wenn R = H). Je nach Rest (R), handelt es sich um Ceramide (R = Wasserstoff), Sphingomyeline (R = Phosphocholin) oder Glycosphingolipide (R = Saccharide) (modifiziert nach Wikipedia Lennert B.)

Die Sphingolipide sind wesentlicher Bestandteil, vor allem der inneren Schicht, der eukaryotischen Zellmembran. Neben dem Erhalt der Membranfluidität, erfüllen sie eine weitere wichtige Funktion als intrazellulärer *second messenger* (116). Zondagc *et al.* konnte 1998 erstmals nachweisen, dass es sich bei einigen Sphingolipiden um extrazellulär aktive Lipidmediatoren handelt (117). Dazu zählen Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Ceramid-1-Phosphat (C1P). S1P und C1P regulieren die Wanderung von Immunzellen, das Zellwachstum und -Überleben (116, 118–120). Des Weiteren sind S1P und C1P in der Regulation vaskulärer, endothelialer Integrität und in inflammatorischen Prozessen von Bedeutung (121–124).

Die *de novo* Synthese der Sphingolipide beginnt mit einer Kondensation von Palmitat und Serin zu 3-Keto-Dihydrosphingosin. Dieses wird durch die Ceramidsynthasen zu Sphinganin reduziert und ist der Vorläufer für die nachfolgenden Dihydroceramide (Abbildung 8).

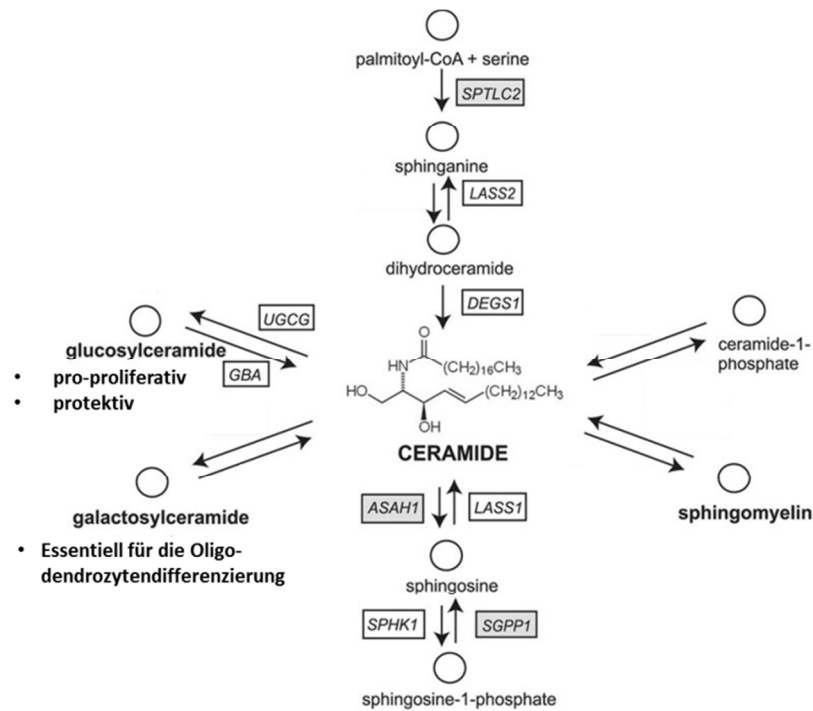


Abbildung 8: Schematische Darstellung der humanen Ceramid- und Sphingolipidsynthese. Zu Anfang kondensieren Palmitat (Palmitoyl-CoA) und L-Serin zu 3-Keto-Dihydrosphingosin. Diese kondensiert dann zu Dihydroceramid und wird anschließend von Ceramidsynthasen zu Dihydroceramiden reduziert. Eine Umwandlung von Dihydroceramide in Ceramide verläuft über die Dihydroceramidasen ab. Die Ceramide sind Vorläufer für Glucosyl-Ceramide, Galactosyl-Ceramide, Sphingomyelin, Ceramid-1-Phosphat und Sphingosin. Letzteres wird mittels der Sphingosinkinasen (SPHK) 1 und 2 phosphoryliert und es entsteht S1P. (modifiziert nach (125)). Die reversible dephosphorylierung von S1P erfolgt durch die S1P-Phosphatasen (SGPP). SPTLC2, Serin-C-Palmitoyltransferase; LASS2, Ceramidsynthase 2; DEGS1, Dihydroceramid-Desaturase; UGCG, Ceramidglucosyltransferase; LASS1, Ceramidsynthase 1; ASAH1, azide Ceramidase; GBA, azide β -Glucosidase.

Dihydroceramidasen konvertieren die Dihydroceramide in Ceramide. Aus diesen können sowohl Glucosyl-Ceramide, Galactosyl-Ceramide, Sphingomyelin, Ceramid-1-Phosphat (C1P) als auch Sphingosin gebildet werden. Während die Glucosyl-Ceramide nachweislich pro-proliferativ und protektiv wirken, sind die Galactosyl-Ceramide essentiell für die Oligodendrozytendifferenzierung (126). Die S1P-Synthese verläuft anschließend über die Sphingosinkinasen 1 und 2. Sphingosin wird phosphoryliert und es entsteht S1P. Der Abbau von S1P kann sowohl irreversible über die S1P-Lyase erfolgen (127). Dabei wird S1P in Hexadecanal und Phosphoethanolamin umgesetzt. Andererseits kann es von S1P-Phosphatasen dephosphoryliert und erneut in Sphingosin umgewandelt werden.

Eine besondere Rolle spielt S1P in der Fibrose. In Verbindung mit TGF- β erhöht es die Kollagen-Expression in Myofibroblasten von Herz, Leber und Nieren und verschlimmert die daraus resultierende Fibrose (128–130). Ebenso induziert S1P in Langerhans-Zellen, Keratinozyten und mesangialen Zellen den TGF- β -Signalweg (131–133). Diese Befunde

weisen nach Radeke, Sauer und Xin auf eine Schnittstelle zwischen dem S1P- und dem, in der Fibrose involvierten TGF- β -Signalweg hin (siehe Abbildung 9).

Interessant ist die Wirkung von S1P in der Lunge. In der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) ist der S1P-Spiegel in der bronchoalveolaren Lavage von SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht. Zusätzlich führt der Spiegel zu einer verstärkten Transition von Lungenepithelzellen zu Myofibroblasten (134). Des Weiteren konnten Sobel *et al.* aufzeigen, dass in normalen Lungenfibroblasten der S1P-Rezeptor-Agonist FTY720-Phosphat eine pro-fibrotische Signalkaskade via den S1P-Rezeptoren S1PR2 und S1PR3 auslöst (135). In einem Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose konnte eine erhöhte Expression des S1P-generierenden Enzyms Sphingosinkinase-1 (SphK-1) festgestellt werden. Wird die SphK-1-Expression experimentell reduziert, führt die damit einhergehende Senkung des S1P-Spiegels zu einer Verringerung der TGF- β -Expression und der pulmonalen Fibrose (siehe Abbildung 9) (136). Diese erhöhte Expression der SphK-1 findet sich ebenso bei Patienten mit IPF und weist auf eine pro-fibrotischen Aktivität von S1P hin. Bei der Dermatofibrose induziert das, durch die SphK-1 produzierte S1P die erhöhte Expression von TIMP-1 (137). Die dafür notwendige SphK-1-Aktivität wird durch TGF- β erreicht. Im Gegensatz zu S1P wirkt sein gesättigtes Analoga dihydro-S1P (dhS1P) anti-fibrotisch, indem es die MMP-1-Expression und den Abbau der ECM erhöht (138). Zusätzlich hemmt dhS1P die Kollagensynthese, während es die TGF- β -stimulierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Smad2/3 verhindert (139). Durch, die in der Arbeit von Bu *et al.* gezeigten nachfolgenden Phosphorylierung von PTEN und dessen gleichzeitiger Translokierung in den Nukleus, kommt es dabei zu einer Komplexierung mit der Smad2/3-Phosphatase. Der komplexierten Phosphatase ist es ferner nicht möglich, Smad2/3 zu phosphorylieren und führt zu einer Reduktion der transkriptionalen Aktivität von Smad2/3. Bei SSc-Patienten konnte in Fibroblasten nachgewiesen werden, dass die PTEN-Expression im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Probanden niedriger ist. Diese verringerte Expressionsrate korreliert mit einer gesteigerten Kollagensynthese und einer reduzierten MMP-1-Expression (140).

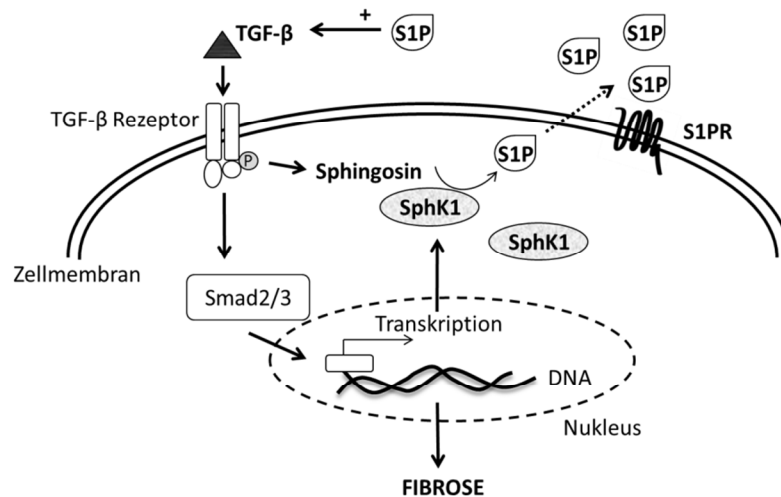


Abbildung 9: Verknüpfungen des TGF-β- und S1P-Signalwegs. Bei Aktivierung des TGF-β-Signalwegs kommt es zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Smad2/3, welcher dann in den Nukleus lokalisiert. Im Nukleus aktiviert das phosphorylierte Smad2/3 die Transkription von u. a. der Sphingosinkinase-1 (SphK1), TIMP-1 und Kollagen. Aufgrund dessen kommt es zur Fibrose. Zusätzlich zu diesem Ablauf, wird durch die Aktivierung des TGF-β-Rezeptors Sphingosin an die SphK1 rekrutiert und dort zu S1P umgesetzt. Das generierte S1P wird aus der Zelle transportiert und wirkt induzierend auf den TGF-β-Signalweg (121, 131, 139, 141).

Im Serum von Sklerodermie-Patienten konnte ein erhöhter S1P-Serumspiegel, aber kein Unterschied in der dhS1P-Konzentration, nachgewiesen werden (142). Das im Blut vorkommenden S1P wird hauptsächlich von Erythrozyten bereitgestellt. Der Herstellung von S1P geht dabei die Aufnahme von Sphingosin voraus, welches in den Erythrozyten mittels SphK-1 in S1P umgesetzt wird (ausführlich beschrieben in (143)). Das generierte S1P wird in den Erythrozyten gespeichert und nach Aktivierung derselben freigesetzt (144–146). Zuvor wurde lange Zeit diskutiert, dass es sich bei den Thrombozyten um die Hautquelle des im Blut-befindlich S1P handelt (147). Diese These wurde jedoch durch neuere Untersuchungen in Zweifel gezogen (146, 148, 149).

Die verbleibenden 20 bis 30 % des S1Ps werden von Endothelzellen sezerniert (3). Endothelzellen exprimieren neben den S1P-generierenden Enzymen SphK-1 und Sphingosinkinase-2 (Sphk-2) auch S1P-degradierende Enzyme wie die S1P-Lyase (SGPL) und die Sphingosinphosphatasen 1 und 2 (SPP-1/-2). Sie sind von großer Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des S1P-Gradienten im Menschen. Während im humanen Plasma S1P-Konzentrationen im einstelligen μM -Bereich gemessen werden konnten (144, 150), wird im Gewebe des menschlichen Organismus ein sehr niedriger S1P-Spiegel vermutet (151, 152). Für die Aufrechterhaltung dieses Gradienten ist eine intakte Endothelzellbarriere notwendig. Dabei kann das im Blut befindliche S1P je nach Rezeptor sehr gegensätzliche Wirkung auf die Endothelzellen haben. Die Aktivierung der

S1P-Rezeptoren S1P1/3 wirkt sich durch eine erhöhte Expression der *adherens junctions* positiv auf die vaskuläre Barriere aus (153–156). Das Gleichgewicht zwischen der Aktivierung des S1P1- und des S1P2-Rezeptors ist eine wichtige Voraussetzung für den Erhalt der EC-Barriere (157). Im Gegensatz zur S1P1-S1P-Interaktion folgt auf die Aktivierung des S1P2-Rezeptors eine Induktion der vaskulären Permeabilität oder eine Inhibition der Angiogenese (158, 159). Erste Studien zeigten bereits einen negativen Einfluss der S1P-S1P2-Achse auch die vaskuläre Morphogenese und die Angiogenese (160). Dies macht deutlich, dass die Wirkung von S1P nicht ausschließlich von der Konzentration, sondern ebenso von dem aktivierten S1P-Rezeptor abhängig ist.

Da in der systemischen Sklerose erste pathologische Veränderungen in der Kapillarstruktur, bzw. der Endothelzellschicht der Kapillaren, sichtbar werden und S1P eine eindeutige Verknüpfung mit dem Fibrose-aktivierenden TGF- β aufweist, wurden in dieser Arbeit speziell S1P und dhS1P als potentielle Biomarker untersucht.

3.7.2.2. Interleukin-33 und ST2

Interleukin-33 (IL-33) ist ein Zytokin und gehört zu der Interleukin-1-(IL-1)-Familie. Die Zytokine der IL-1-Familie sind wichtige Faktoren bei der frühen Immunregulation in der Entzündung. Sie modulieren unter anderem die Expression von Chemokinen, weiteren Zytokinen und MMPs (161). Während der Rezeptor von IL-33 lange Zeit bekannt war (162, 163), wurde IL-33 erstmals von Schmitz *et al.* beschrieben (164). Das Zytokin besteht aus drei Domänen: der zentralen, der IL-1-ähnlichen und der nukleären Domäne (siehe Abbildung 10). Es wird in vielen Organen exprimiert, u.a. in Lunge, Leber und im zentralen Nervensystem. IL-33 findet sich vor allem in Epithel- und Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen sowie Fibroblasten (165–167). In ruhenden Endothelzellen ist IL-33 im Nukleus lokalisiert und fungiert dort als transkriptionaler Repressor (168, 169). Kommt es zur Aktivierung oder zur Schädigung der Endothelzellen wird das nukleäre IL-33 in das Zytoplasma der Zelle transportiert und später in den extrazellulären Raum, bzw. Blutgefäße, abgegeben. Erste Publikationen weisen darauf hin, dass nach einer Zellschädigung freies IL-33 eine Funktion als „Alarmin“, alarmgebendes Zytokin, übernimmt (166, 170). Dabei erfüllen die unterschiedlich prozessierten IL-33-Isoformen verschiedene Funktionen. Das nukleär-lokalisierte besitzt keine Rezeptor-abhängige Zytokinaktivität, während das prozessierte IL-33 entweder sehr starke Effekte hervorrufen oder durch die Prozessierung inaktiviert werden kann. Bei der Apoptose wird IL-33 von

den Caspasen 3 und 7 in der Zytokin-1-ähnlichen Domäne geschnitten und inaktiviert (170, 171). Kommt es zu einer Zellschädigung oder zu Zellstress, wird IL-33 entweder als unprozessiertes Zytokin freigesetzt oder inflammatorische Proteasen schneiden es in der zentralen Domäne (siehe Abbildung 10) (171, 172)). Das daraus resultierende IL-33 ist aktiver als das vollständige IL-33, kann aber ebenso Immunzellen rekrutieren und bei der Auflösung der Entzündung helfen.

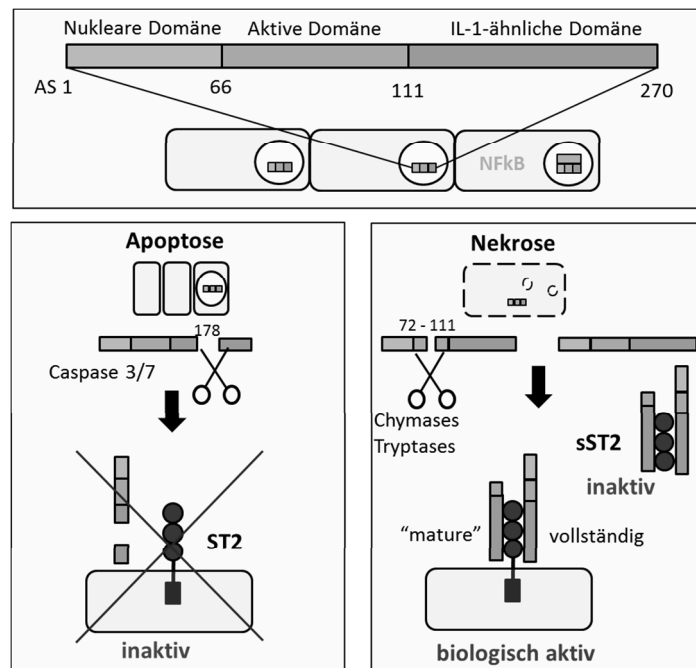


Abbildung 10: Splicevarianten des IL-33 und dessen Funktionen (modifiziert nach Florian Ottenlinger, 2015). IL-33 besitzt unterschiedliche Effekte je nach translationaler Prozessierung. Obere Reihe: In der Homöostase liegt es im Nukleus von Epithel- und Endothelzellen vor und wirkt als nuklearer Repressor der Transkription. Bei der Apoptose spalten die Caspase 3 oder 7 IL-33 in der IL-1-ähnlichen Zytokindomäne, wodurch es inaktiviert wird (links). Bei einer aktiven Zellschädigung oder Zellstress wird IL-33 entweder als vollständiges Molekül freigesetzt und agiert als Alarmin oder es wird von Proteasen in der zentralen Domäne geschnitten und hat danach eine noch stärker Zytokinaktivität inne (rechts). Beides führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen mit dem Ziel der Auslösung des „Entzündungsmilieus“.

Die IL-33-Aktivität wird über den dazu gehörigen heterodimeren Rezeptor ST2 vermittelt. Er besteht aus ST2 und dem „Rezeptoraccessorprotein“ IL-1RacP. Die IL-33-Effekte werden durch die anschließende intrazelluläre Signalkaskade durch IRAK1/4, MyD88 und TRAF-6 ausgelöst (173). Während es von IL-1RacP nur eine Variante gibt, existieren von ST2 drei Splicevarianten. Für die IL-33-Signalkaskade ist die membrangebundene Form ST2L wichtig (174), wohingegen die lösliche Form sST2 und deren Wirkung (engl. *soluble ST2*) als „Abbaurezeptor“ von zirkulierendem IL-33 diskutiert wird (175). Kurze Zeit später wurde die dritte Form, ST2V, als Variante des ST2L entdeckt (176).

Anfänglich wurde IL-33 den Zytokinen der Th2-Antwort zugeordnet, da der Rezeptor ST2L ausschließlich auf Th2-Zellen nachgewiesen werden konnte (164). Neuere Publikationen ziehen diese erste Zuordnung in Zweifel, da es vermehrt Hinweise gibt, dass IL-33 pleiotrope Effekte besitzt. In einem Mausmodell der akuten Colitis erhöht IL-33 die TGF- β -induzierte T_{reg}-Differenzierung und zum anderen verstärkt es die Akkumulation von regulatorischen T-Zellen in dem entzündeten Gebiet (177). Blockiert man hingegen die IL-33/ST2-Achse in einem Mausmodell des allergischen Asthmas, führt dies zu einer Reduktion von IL-4, IL-5, IL-13 und einer Verbesserung der Entzündung der Atemwege (178). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Lungenepithelzellen, die durch Allergene geschädigt werden, eine Th2-Immunantwort mittels IL-33-Expression induzieren (179). Im Gegensatz dazu, zeigte ein ähnliches Mausmodell der Atemwegserkrankungen, dass Mastzellen mittels IL-33-Stimulation eine Th17-Antwort generieren (180).

Bei der Differenzierung von CD8⁺-Zellen nimmt IL-33 eine wichtige Rolle ein. Es verstärkt die Effektorfunktion von CD8⁺-Zellen indem es mit dem T-Zellrezeptor und dem IL-12-Signalweg synergistisch agiert (181) und es verstärkt die klonale Expansion von zytotoxischen T-Lymphozyten bei einer anti-viralen Immunantwort (182). Interessanterweise ist IL-33 an der transkriptionellen Herunterregulation von S1P1 in CD8⁺-Zellen beteiligt (183).

Welche Rolle IL-33 in der systemischen Sklerose einnimmt, ist bis heute ungeklärt. Erste Untersuchungen zeigen, dass IL-33 sowohl im Serum von SSc-Patienten erhöht ist, als auch, dass es seine nukleäre Lokalisation im Laufe der Erkrankung ändert (184, 185). Es liegt nahe, dass IL-33 eine Rolle bei der Schädigung der Endothelzellen zu Beginn der Erkrankung spielt. Dafür spricht, dass die IL-33-Serumspiegel vor allem bei Sklerodermie-Patienten, die sich im frühen Stadium der Erkrankung befinden, höher sind als bei gesunden Probanden oder SSc-Patienten mit einer längeren Krankheitsdauer (19). Daher wurden sowohl IL-33 als auch sST2 bei lcSSc-Patienten untersucht.

3.7.2.3. Wnt-Signalmoleküle

Der kanonische Wnt-, auch bekannt als Wnt/ β -Catenin-Signalweg, ist ein wichtiger Regulator der Zellfunktion in der Embryogenese und in adulten Organismen. Die Signalgebung erfolgt durch ein Wnt-Molekül, das sich an den extrazellulären Bereich des Rezeptorkomplex Frizzled-LRP5/6 bindet. Nach Aktivierung des Rezeptorkomplexes kommt es zu einer Phosphorylierung von Dishevelled (Dsh), einem im Zytoplasma

lokalisiertem Phosphoprotein (Abbildung 11). Dieses Phosphoprotein verhindert die Etablierung eines β -Catenin-Degradationskomplexes aus Axin, GSK3 und APC (186, 187). Beim β -Catenin handelt es sich um das eigentliche Signalmolekül des Wnt-Signalweges. Es liegt zytoplasmatisch vor und kann in den Nukleus translozieren, um dort mit dem Transkriptionsfaktor TCF die Transkription der Zielgene zu aktivieren (188, 189). Wenn der Degradationskomplex β -Catenin abbaut, wird dieser Signalweg unterbrochen, und es kommt zur keiner Transkription (190). Der Wnt-Signalweg kann zusätzlich über einen weiteren Mechanismus unterbrochen werden. Bindet sich der Wnt-Inhibitor Dickkopf-1-ähnliches Protein (DKK-1) an LRP5/6, verhindert dies eine Interaktion von Wnt mit dem Rezeptorkomplex Frizzled-LRP5/6 (Abbildung 11) (191). Neben DKK-1 gibt es viele weitere Wnt-Inhibitoren, z. B. Cerberus und WIF-1 (192).

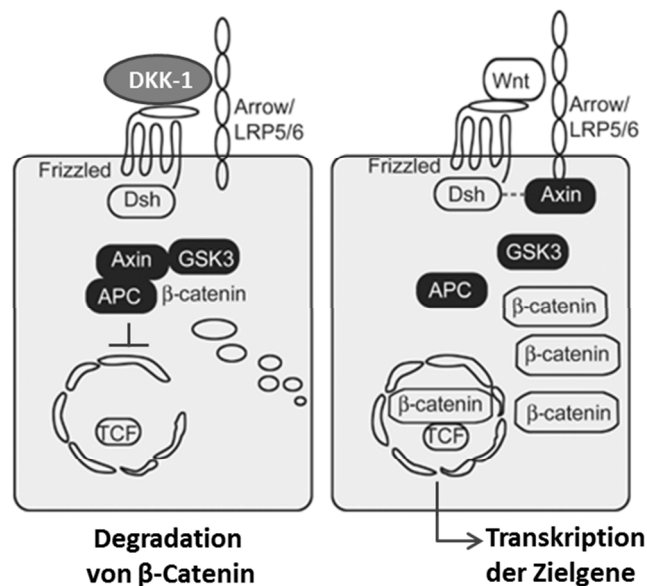


Abbildung 11: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges (modifiziert nach (193)). Bei Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Bindung eines Wnt-Moleküls an den Rezeptorkomplex LRP5/6-Frizzled kommt es zur Aktivierung von Dishelved (Dsh) und daraufhin wird die Bildung des Degradationskomplexes unterbunden. Der Komplex besteht aus Axin, GSK3 und APC und bewirkt, bei inaktivem Wnt-Signalweg, die Degradation von β -Catenin. Ist die Degradation unterbrochen, transloziert das β -Catenin in den Nukleus und aktiviert dort zusammen mit TCF die Transkription der Zielgene. Der Wnt-Signalweg kann ebenfalls durch spezifische Inhibitoren, z. B. das Dickkopf-1-verwandte Protein (DKK-1), blockiert werden. DKK-1 bindet dabei an LRP5/6 und verhindert eine Interaktion von Frizzled und LRP5/6.

Bereits eine geringe Veränderung in dem Gleichgewicht des Wnt-Signalweges ist mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert. Darunter fallen Erkrankungen der Knochen (zusammengefasst in (194)), verschiedene Krebsarten (195, 196) und fibrotischen Erkrankungen (197).

Besonders interessant ist Beteiligung des Wnt-Signalweges an der *Epithelial-to-Mesenchymal*-Transition (EMT), der Umwandlung von Epithelzellen zu Myofibroblasten am Anfang fibrotischer Veränderungen. In Lungenepithelzellen induziert β -Catenin die EMT während der Entstehung einer pulmonalen Fibrose (198, 199). Ebenso erhöht β -Catenin die Expression von ECM-Komponenten in Fibroblasten der Haut und fördert einen profibrotischen Phänotyp (200). Speziell in der Sklerodermie konnte eine veränderte Konzentration von DKK-1, Wnt-1 und Wnt10b in der Haut von Patienten nachgewiesen werden (201). Eine gesteigerte Lokalisation nukleären β -Catenins spricht ebenfalls für eine erhöhte Aktivität des Wnt-Signalweges. Ähnlich zu Akhmetshina zeigten bereits Wei *et al.*, dass Wnt10b in Hautbiopsien eines SSc-Mausmodells erhöht ist (202). Des Weiteren konnte für die diffuse Form der Sklerodermie eine erhöhte Wnt-Aktivität im Serum, sowie eine erhöhte Wnt-2-Konzentration in Hautbiopsien gezeigt werden (203). Obwohl viele Befunde vorliegen, ist die pathologische Rolle des Wnt-Signalweges in der Sklerodermie unvollständig geklärt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie Wnt-Inhibitoren bezüglich ihre Eignung als potentielle Biomarker analysiert.

4. Zielsetzung

Angesichts der fehlenden oder bisher nicht aussagekräftigen Biomarker für die Frühdiagnose der systemischen Sklerose, sollten in der vorliegenden Arbeit, bis heute in der Sklerodermie-Forschung nur wenig berücksichtigte, Signalwege und ihre beteiligten Signalmoleküle auf ihr Potential als Biomarker untersucht werden. Um infrage kommenden Moleküle zu finden, wurden drei unterschiedliche Signalkaskaden detaillierter betrachtet. Dazu zählten die IL-33/ST2-Achse, der Wnt-Signalweg und die Lipidmediatoren der Sphingolipide. Die einzelnen Moleküle der genannten Signalwege wurden anhand aktueller Publikationen aus dem Bereich der Fibrose- und Sklerodermie-Forschung insbesondere auch der GWAS-Studien in dieser und verwandten Autoimmunerkrankungen ausgewählt.

Diesem Projekt liegt die Hypothese zugrunde, dass sich der pathologisch erste Schritt bei der systemischen Sklerose in den Kapillaren, speziell den Endothelzellen abspielt. Einen ersten Anhaltspunkt dafür stellt das sekundäre Raynaud-Phänomen, welches mit Veränderungen der Kapillarstruktur in dem Nagelfalz einhergeht und zumeist als erstes klinisches Symptom der Sklerodermie auftritt, dar. Daher zeichnen sich die drei genannten Signalwege zusätzlich dadurch aus, dass sie in dem Erhalt des Endothelzellmetabolismus und der -interaktion wichtig sind.

Zur Validierung der infrage kommenden Moleküle wurden diese bereits etablierten und neu vorgestellten Biomarkern für die Dermatofibrose gegenübergestellt. Um eine spätere Anwendung der potentiellen Biomarker möglichst einfach zu gestalten, wurde als Untersuchungsmatrix Serum bzw. Plasma verwendet. Es kann im Rahmen einer Routineuntersuchung gewonnen werden und könnte später, bei erfolgreicher Validierung, zusätzlich auf die Biomarker hin getestet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluation einfach anwendbarer und früh diagnostizierbarer serologischer Biomarker für die Autoimmunerkrankung der limitierten systemischen Sklerose zu evaluieren.

5. Material

5.1. Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Binokular	Axiovert 25	Carl Zeiss NV-SA, Belgien
Elektrophorese-Stromversorgung	Mini-Sub Cell GT	Biorad, CA, USA
Elektrophoresekammer	Subcell GT	Biorad, CA, USA
ELISA Reader	SpectraMax® M5/M5e Multimode Plate Reader	Molecular Devices, CA, USA
Feinwaage	BP 211 D	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationssystem	Molecular Imager® Gel Doc™ XR System	Biorad, Hercules, CA, USA
Heizblock	Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	BBD 6220	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kapillarmikroskop	Optilia Video Capillaroscope	Optilia, Sollentuna, SW
Pipettierhilfe	Pipette boy comfort	IBS Integra Bioscience, Chur, CH
Spektralphotometer	ND-1000 UV/Vis	NanoDrop Technologies, USA
Vortexmischer	Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	572-45	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
	Hermle Z513K	Hermle Labortechnik, Wehingen

5.2. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Bovines Serum-Albumin, Probumin	Merck, Darmstadt
Chloroform	Applichem, Darmstadt
EDTA	Applichem, Darmstadt
Ethanol, 99,98% p.A.	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FCS	Biochrom/Merck Millipore, Darmstadt
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
H ₂ SO ₄ , 98%	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat	Applichem, Darmstadt
Methanol, 99,8%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
S1P	Cayman Chemicals, MI, USA
Substrate A und B	R&D Systems, Inc., MN, USA
Tween	Applichem, Darmstadt
Tris	Applichem, Darmstadt

5.3. Lösungen

Lösung	Hersteller
Eisessig	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Gibco® Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Life Technologies, UK
PBS ²⁻	Gibco, Life Technologies, UK

Lösung	Hersteller
Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
TC10™ Trypanblau, 0,4%	Biorad, Hercules, CA, USA

5.4. Kits

Kit	Hersteller
Human COMP DuoSet	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Human DKK-1 DuoSet	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Human IL-33 DuoSet	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Human Lysyl-Oxidase ELISA	USCN Life Science, Wuhan, Hubei, CH
Human ST2/IL-1 R4 DuoSet	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Human XL Cytokine Array Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Alle Kits wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

5.5. PC-Software

- Adobe Photoshop CS, Adobe Systems Software Ireland Ltd., CA, USA
- Citavi 3, Swiss Academic Software GmbH, CH
- GraphPad Prism 5.04, GraphPad Software, CA, USA
- Microsoft Excel, Power Point, Word 2010, Microsoft Corporation, WA, USA
- NanoDrop 3.1.0., Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
- Quantity One, BioRad, Biorad, CA, USA
- SoftMaxPro 5, Molecular Devices, CA, USA
- Software 7500 FAST System v. 2.0.6, Applied Biosystems, Life Technologies, USA

5.6. Normal- und Patientenkollektiv

Die Rekrutierung der gesunden Probanden, der Patienten mit 1. Raynaud Phänomen und mit limitierter Systemischer Sklerose (SSc) mit einer Krankheitsdauer von mehr als vier Jahren erfolgte in der Rheumatologie des Universitätsklinikums Frankfurt. Die Proben weiterer gesunder Probanden, der nach LeRoy klassifizierten SSc-Patienten, der Patienten mit diffuser SSc und der Patienten mit limitierter Sklerodermie, mit einer Krankheitsdauer von einem Jahre bis hin zu mehr als neun Jahren, wurden von der Abteilung Rheumatologie des Karolinska Instituts in Solna/Stockholm (Schweden) bereitgestellt.

5.6.1. Einverständnis, Pseudonymisierung und Ethikantrag

Entsprechend der Deklaration von Helsinki (ICH/GCP) wurde zu Beginn der Studie von allen Probanden und Patienten die schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Daten jedes Patienten oder Probanden wurden pseudonymisiert. Das gesamte Protokoll zur Verwendung der humanen Proben wurde zuvor durch einen Antrag bei der Ethikkommission der Uniklinik Frankfurt (#192/11) bzw. der entsprechenden Ethikkommission des Karolinska Instituts (#2006/259-31/3, #2013/2209-32) genehmigt.

5.6.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Als Kontrollkollektiv wurden für die vorliegende Studie 38 gesunde Probanden, davon 28 deutsche und zehn schwedische Individuen, rekrutiert. Weiterhin wurden zwölf Patienten mit primärem Raynaud-Phänomen in die Studie eingeschlossen. In dem Karolinska Institut, Stockholm, wurden Proben von 48 Sklerodermie-Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsdauer und -ausprägung zusammengestellt. Weitere 29 Patienten mit systemischer Sklerose wurden in der Rheumatologie in Frankfurt rekrutiert.

Für den Einschluss der Sklerodermie-Patienten wurden die Richtlinien der amerikanischen Akademie für Rheumatologie (*American College of Rheumatology*, ACR) verwendet. Eine Kurzfassung der Kriterien ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Kriterien der Amerikanischen Akademie der Rheumatologie (ACR) zur Klassifizierung von systemischer Sklerose (81).

Gegenstand	Unterposition	Gewichtung (Score)
Verdickung der Haut beider Hände proximal zu den MCP-Gelenken	-	9
Hautverdickung der Finger	a) <i>Puffy fingers</i>	2
	b) Sklerodaktylie der Finger (distal des MCP-Gelenks, proximal des Interphalangealgelenks)	4
Läsionen der Fingerspitzen	a) Digitale Ulzerationen	2
	b) Grübchenförmige Narben an der Fingerkuppe	3
Telangiectasie	-	2
Abnormale Nagelfalzkapillaren	-	2
Beteiligung der Lunge (max. Score ist 2)	a) Pulmonal-arterielle Hypertonie	2
	b) Interstitielle Lungenkrankheit	2
Raynaud-Phänomen	-	2
SSc-verwandte Auto-Antikörper (max. Score 3)	a) Antizentromer	3
	b) Anti-Topoisomerase I	3
	c) Anti-RNA-polymerase III	3

MCP: Metacarpophalangealgelenk

Eine Gesamtwertung von 9 oder mehr Punkten wurde laut ACR als vorliegende Sklerodermie-Erkrankung definiert. Weiterhin wurden die Subformen der lcSSc und dcSSc nach LeRoy und Medsger (17) abgegrenzt.

Zur genaueren Erfassung der anfänglichen pathologischen Vorgänge der Erkrankung wurden zusätzliche Patienten nach den Kriterien der frühen systemischen Sklerose (77) bewertet und eingeschlossen. Als Ausschlusskriterien galt für alle Sklerodermie-Patienten ein Alter niedriger als 18 Jahre, das Vorliegen weiterer Autoimmunerkrankungen, Schwangerschaft und Gerinnungsstörungen.

Für die Gruppe der Patienten mit primärem Raynaud-Phänomen (1.RP) waren folgende Kriterien Voraussetzung für den Einschluss in die Studie:

- Innerhalb der letzten 12 Monate aufgetretenes primäres Raynaud-Phänomen
- Keine pathologische Veränderung der Nagelfalzkapillare
- Keine vorliegenden aktuellen Infekte und Autoimmunerkrankungen
(z. B. Diabetes, Sjörgen Syndrom)
- Alter über als 18 Jahre

Das Kontrollkollektiv wurde alters- und geschlechtsspezifisch passend zu den Patientengruppen rekrutiert. Zum Ausschluss führten weitere vorliegende Autoimmunerkrankungen außer der Sklerodermie, aktive Infekte (z.B. grippaler Infekt) und ein Alter von weniger als 18 Jahren.

5.6.3. Normalkollektiv

Zur Bestimmung der Normalwerte für die, in dieser Arbeit erforschten Parameter, wurden 38 Serumproben von gesunden Probanden (Ctrl) gewonnen und untersucht. Vier Probanden konnten auf Grund nachträglich bekanntgewordener Allergien nicht verwendet werden. Die demoskopischen Daten des Normalkollektivs sind in Tabelle 5 zu finden.

Zusätzlich wurden Patienten rekrutieren, die innerhalb der letzten zwei Jahre ein aktives primäres Raynaud-Phänomen aufwiesen. Es konnten neun 1.RP Patienten in Zusammenarbeit mit dem, in Frankfurt niedergelassenen, Angiologen Herr Dr. med. Matthias Erbe rekrutiert werden. In Tabelle 5 sind die demoskopischen Daten der 1.RP Patienten zu finden.

Tabelle 5: Charakteristika des Frankfurter und Karolinska-Normalkollektivs

	Serum Ctrl	Serum 1.RP	Plasma Ctrl
n	34	9	112
Frauen, n (%)	29 (85,3)	8 (90,9)	95 (84,8)
Alter, Median (Intervall)	55,7 (38 - 77)	53,3 (33 - 75)	61,2 (21 - 85)

5.6.4. Patientenkollektiv

Die Patienten mit systemischer Sklerose wurden unterteilt in Patienten mit limitierter Sklerodermie (lcSSc) und diffuser systemischer Sklerose (dcSSc). Die Patienten mit limitierter SSc wurden aufgrund ihrer Krankheitsdauer in Subgruppen gegliedert. Eine besondere Gruppe stellte dabei die LeRoy-Gruppe dar. Patienten dieser Gruppe, wurden zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme als Patienten mit dem frühen Vorstadium der systemischen Sklerose klassifiziert. Für alle Sklerodermie-Patienten wurden zusätzlich folgende Parameter erhoben: Auto-Antikörperstatus, kapillarmikroskopischer Status der Nagelfalz, Hautbeteiligung modifiziert nach Rodnan (mRSS) und das Vorkommen von Calcinosis cutis, rheumatoider Arthritis, digitalen Ulzerationen, pulmonaler Hypertonie (PAH) und interstitielle Lungenerkrankung (ILD). Die demoskopischen Daten sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Charakteristika der deutschen und schwedischen Patienten mit systemischer Sklerose

	Serum					Plasma
	LeRoy	lcSSc (1-3 J.)	lcSSc (4-9 J.)	lcSSc (> 9 J.)	dcSSc	lcSSc
Anzahl (n)	10	15	23	19	20	175
Frauen, n (%)	9 (90)	12 (80)	17 (73,9)	16 (84,2)	18 (85)	142 (81,1)
Alter, Median (Intervall)	55,8 (27 - 76)	59,8 (42 - 75)	58,2 (30 - 76)	64,1 (47 - 75)	57,2 (39 - 77)	59,7 (21 - 84)
Alter bei Erkrankung, Median (Intervall)	50,9 (22 - 75)	58,1 (42 - 75)	49,2 (23 - 71)	43,1 (31 - 58)	49,3 (27 - 67)	n. b.
Krankheitsdauer, Median (Intervall)	4,9 (1 - 17)	1,7 (1 - 3)	6,7 (4 - 9)	18,75 (10 - 29)	8 (1 - 40)	n. b.

n. b. nicht bekannt; lcSSc, auf die Haut limitierte systemische Sklerose; dcSSc, diffuse systemische Sklerose

6. Methoden

6.1. Methodik der klinischen Untersuchungen

6.1.1. Kapillarmikroskopische Untersuchung

Die Beurteilung der pathophysiologischen Veränderungen der Nagelfalzkapillaren erfolgte per Kapillarmikroskopie. Mit Hilfe eines Auflichtmikroskops wurden die Kapillaren in dem Nagelfalz mit 200-facher Vergrößerung dargestellt und dokumentiert. Zu Anfang der Untersuchung erfolgte die Auftragung eines Tropfens Öl auf den Nagelfalz und das Mikroskop wurde an der entsprechenden Stelle aufgesetzt. Für ein Gesamtbild der vaskulären Struktur, wurden, bis auf die Daumen, alle Finger beider Hände untersucht. Von jedem Finger wurden zwei Bilder der Kapillarstruktur erstellt und zur späteren Auswertung gespeichert. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ nach Cutolo (204). Pro Millimeter wurden die pathologischen Veränderung, darunter Megakapillare, Einblutungen und avaskuläre Gebiete, dokumentiert. Die Einteilung der kapillarmikroskopischen Veränderungen erfolgte anhand ihrer Schwere in drei Stadien (früh, aktiv und spät).

6.1.2. Erhebung des modifizierten Rodnan-Hautscores

Die Beurteilung der Hautbeteiligung der SSc-Patienten erfolgte anhand des modifizierten Rodnan-Hautscores (*modified Rodnan skin score*, mRSS). Dazu wurden bei jedem Patienten 17 festgelegte Areale auf die Abhebbarkheit und die Dicke der Haut untersucht. Zu den Arealen zählten das Gesicht, der frontale Thorax, das Abdomen, der rechte und linke Arm sowie die Finger, die Hände, die Unter- und Oberarme, die Ober- und Unterschenkel und die Füße. Der Untersucher hob dafür in den vorgeschriebenen Bereichen die Haut kurz zwischen zwei Fingern an und beurteilte die Dicke und Abhebbarkheit. Anschließend wurde der gewonnen Eindruck in einen semi-quantitativen Score umgesetzt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Semi-quantitativer Score zur Verwendung bei der Erstellung des mRSS

Score	Eindruck
0	Normale Hautdicke
1	Leichte Hautverdickung, etwas schlechter Abhebbarkeit der Haut
2	Mäßige Hautverdickung, schlechte Abhebbarkeit der Haut
3	Schwere Hautverdickung, Haut nicht oder nur sehr gering abhebbar

Der mRSS reicht von 0 Punkten bis zu 51 Punkten und erlaubt eine Einteilung der Schwere der Hautbeteiligung wie in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Beurteilung der Hautbeteiligung anhand des mRSS

mRSS	Schweregrad
0	normal
1 - 14	gering
15 - 29	mäßig
30 - 39	schwerwiegend
> 40	final

6.1.3. Gewinnung des humanen Serums und Plasmas

Material:

- S-Monovette® Kalium-EDTA (9 ml und 2,7 ml) (Plasma)
- S-Monovette® Serum (9 ml)
- S-Monovette® Serum-Gel (9 ml und 4,7 ml)

Zur Gewinnung des humanen Serums und Plasmas wurden S-Monovetten® (Sarstedt) eingesetzt. Im Rahmen der Sklerodermie-Sprechstunde (Rheumatologie, Universitätsklinik Frankfurt) wurden jeweils 9 bis 10 ml in einer S-Monovette® Serum und einer

S-Monovette® Kalium-EDTA gesammelt und mit Antikoagulanzen (Kalium-EDTA) präparierte Monovetten gründlich gemischt. In der Rheumatologischen Tagesklinik wurden „Serum-Gel“- und „Kalium-EDTA“-(2,7 ml)-Monovetten bei der Blutentnahme verwendet. Die Serumproben („Serum“ und „Serum-Gel“) wurden anschließend für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur aufrecht stehend gelagert. Zur Gewinnung des Serums und Plasmas wurden die Monovetten mit 1500 x g für 10 Minuten zentrifugiert und das Serum bzw. das Plasma in Aliquots von 500 bis 1000 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen Eppendorf bei - 80°C eingefroren.

6.1.4. Klinische Chemie und Hämatologie

Die Untersuchungen zur klinischen Chemie, Hämatologie und zur Bestimmung der Autoantikörper wurden im Zentrallabor der Universitätsklinik Frankfurt durchgeführt.

6.1.5. LC-MS/MS-Messung

Die Erstellung der Sphingolipid-Profile erfolgte angelehnt an das bereits von Schmidt *et al.* publizierte Protokoll (205) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Geisslinger insbesondere in der Zusammenarbeit mit Dr. Ferreirós Bouzas und Yannick Schreiber. Dabei wurden die Sphingolipide Sphingosin, S1P, dhS1P sowie die Ceramide mit einer Kettenlänge von C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C24:0, C18:1, C24:1 und C16:0-Dihydroceramid, C18:0-Dihydroceramid, C24:0-Dihydroceramid und C18:1-Dihydroceramid im Serum der SSc-Patienten und Kontrollindividuen analysiert. Die Auswertung der Primärdaten (LC-MS/MS-Spektren) erfolgte durch Yannick Schreiber und Dr. Ferreirós Bouzas.

Material:

- Extraktionslösung (Chloroform:MeOH:HCl, 83:15:2 (v/v/v))
- Zusammensetzung des internen Standards:
 1. C17:0-Sphingosin, C17:Dihydroceramid, C17:0-S1P, C17:0-Ceramid (je 500 ng/ml) in Methanol (MeOH)
 2. D7-Sphingosin, D7-Dihydroceramid, D7-S1P, D7-Ceramid (je 500 ng/ml) in MeOH

- Standardreihe für die Ceramid- und die Sphingolipidmessung:
Sphingosine, S1P, dhS1P, Dihydroceramid, je 0,25 ng/ml bis 250 ng/ml in MeOH
- Standardreihe für die Glucosyl-Ceramidmessung:
Glucosyl-Ceramide C16:0 und Glucosyl-Ceramid C24:1 je 0,3 ng/ml bis 500 ng/ml in MeOH
- MeOH
- PBS²⁻
- Kurzgewindeflaschen mit Glas- μ -Einsatz (A-Z Analytik-Zubehör, Langen)

Die quantitative Erfassung der Sphingolipide und der Ceramide in humanem Serum und Plasma erfolgte per LC-MS/MS. Bei den ersten Messungen wurde der interne Standard 1 verwendet. Sobald D7-markierte Sphingolipide erhältlich waren, wurde bei den Messungen der interne Standard 2 eingesetzt. Dazu wurden aus den Sera die Lipide extrahiert. Zeitgleich wurde eine Standardreihe zur quantitativen Bestimmung der Sphingolipid-Konzentrationen erstellt. Dafür wurden folgende Probenansätze erstellt:

Tabelle 9: Zusammensetzung der Standardreihe und der Proben für die Sphingolipidextraktion.

Ansatz pro Probe	Volumen	Ansatz pro Standardwert	Volumen
Serum	20 μ l	Jeweiliger Standard	20 μ l
PBS ²⁻	30 μ l	PBS ²⁻	50 μ l
MeOH	20 μ l	Interner Standard	20 μ l
Interner Standard (IS)	20 μ l	Wasser	80 μ l
Wasser	80 μ l		
Ansatz Leerwert		Ansatz Doppelleerwert	
PBS ²⁻	50 μ l	PBS ²⁻	50 μ l
MeOH	20 μ l	MeOH	20 μ l
Interner Standard	20 μ l	MeOH (anstelle IS)	20 μ l
Wasser	80 μ l	Wasser	80 μ l

Die Probenansätze wurden mit je 600 μl Extraktionslösung versetzt. Der Reaktionsansatz wurde, in jedem Schritt der eine Durchmischung aller Bestandteile benötigt, mindesten 30 Sekunden gemischt. Nach gründlichem Durchmischen wurde der Ansatz für 5 Minuten mit 16060 x g zentrifugiert und anschließend die organische, untere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In dieses Gefäß wurden erneut 600 μl Extraktionslösung zugegeben und die Probe gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 Minuten, 16060 x g) wurde die organische Phase in ein drittes Reaktionsgefäß überführt und das organische Lösemittel bei 45°C abgedampft. Die Ansätze wurden jeweils in 50 μl MeOH aufgenommen und in Kurzgewindeflaschen mit Glas- μ -Einsatz überführt. Die Analyse wurde mit einem Tandem-Massenspektrometer (Sphingolipide und Glucosylceramide: API 4000, AB Sciex, Darmstadt; Ceramide: 4000 QTrap, AB Sciex) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit Software der Firma Applied Biosystems.

6.1.6. Nachweis des humanem IL-33 und seines Rezeptors ST2

Das Zytokin IL-33 und sein löslicher Rezeptor sST2 wurden mittels ELISA im Serum der Patienten- und Probandenproben, wie bereits bei Bergis *et al.* beschrieben (4), analysiert. Das Serum oder Plasma wurde unverdünnt oder bei zu hohen IL-33- oder sST2-Konzentrationen erneut untersucht nachdem die betroffene Probe 1:2 oder 1:4 mit dem vom Hersteller empfohlenen Verdünnungsreagenz versetzt wurde.

Material:

- Human IL-33 DuoSet
- Human ST2/IL-1 R4 DuoSet
- Waschpuffer (1x PBS, 0,05 % Tween 20)
- Block-Puffer (1x PBS, 1 % BSA)
- H_2SO_4 (1 M)

Zum quantitativen Nachweis des humanem IL-33 Proteins oder des humanen ST2-Proteins in Serum oder Plasma wurden *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA; Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest) angewendet. Sowohl für die Quantifizierung von hIL-33 als auch für hST2 wurde ein ELISA von R&D verwendet. Für alle Proben wurden Doppelwerte analysiert. Die Durchführung der ELISA erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Extinktionswerte (450 nm und 570 nm) wurden gemessen und die Konzentration der zu bestimmenden Cytokine anhand der zeitgleich erstellten Standardgeraden berechnet.

6.1.7. Nachweis des humanem DKK-1 und COMP

Material:

- Human DKK-1 DuoSet
- Human COMP DuoSet
- Waschpuffer (1x PBS, 0,05 % Tween20)
- Block-Puffer (1x PBS, 1 % BSA)
- H₂SO₄ (1 M)

Zum quantitativen Nachweis von humanem Dickkopf-1 (DKK-1) oder humanen oligomerischem Knorpel-Matrix-Protein (COMP) in Patienten-Sera wurden die entsprechenden ELISA angewendet. Sowohl für die Quantifizierung von hDKK-1 als auch für hCOMP wurde ein ELISA von R&D verwendet. Für alle Proben wurden Doppelwerte analysiert. Die Durchführung der ELISA erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Extinktionswerte (450 nm und 570 nm) wurden gemessen und die Konzentration der zu bestimmenden Cytokine anhand der zeitgleich erstellten Standardgeraden berechnet.

6.1.8. Nachweis der humanen Lysyl-Oxidase

Material:

- Human Lysyl Oxidase ELISA
- Waschpuffer (1x PBS, 0,05 % Tween20)
- Block-Puffer (1x PBS, 1 % BSA)
- H₂SO₄ (1 M)

Der quantitative Nachweis zirkulierender Lysyl-Oxidase in humanem Serum erfolgte per ELISA von USCN. Alle Proben wurden entsprechender der Herstellerangabe vor der Untersuchung 1:100 in PBS²⁻ verdünnt und analysiert. Die Extinktion (450 nm) wurde gemessen und anschließend anhand der parallel erstellten Standardgeraden die enthaltene Lysyl-Oxidase-Konzentration der Sera berechnet.

6.1.9. XL Cytokine Array

Material:

- Pierce ECL Western Blotting Substrat
- Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Science)
- Humaner XL Cytokine Array Kit

Mit dem XL Cytokine Array Kit können 102 humane Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren zeitgleich auf Proteinebene in Serumproben nachgewiesen werden. Die ausgewählten Proben wurden entsprechend den Herstellerangaben mit dem Kit untersucht. Die Auswertung erfolgte densitometrisch.

6.1.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Graph Pad Prism 5.0. Die Anzahl der in die Auswertung einbezogenen Patienten bzw. Datenpunkte ist zu jeder Untersuchung als ($n = x$) oder ausgeschrieben in der Abbildungsbeschriftung angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte für voneinander unabhängige Variablen mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test sowie dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunns Post-Test. Voneinander abhängige Variable wurden mit dem Wilcoxon-*matched-pairs-signed-rank*-Test oder dem *Two way* ANOVA analysiert. Korrelationsanalysen erfolgten mit den Spearmans (Rang-)Korrelationskoeffizienten. Die jeweils angewandte Analyse ist bei jedem Datensatz separat aufgeführt. Die berechneten Signifikanzen (p) sind bei den entsprechenden Abbildungen detaillierter aufgeführt.

Alle hier gezeigten graphischen Auswertungen wurden mit Graph Pad Prism 5.0 erstellt. Die Ergebnisse sind dargestellt mit dem jeweiligen Mittelwert und teilweise dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

7. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit wurde an dem Universitätsklinikum Frankfurt im Institut für allgemeine Pharmakologie und Toxikologie in der Arbeitsgruppe „Immunpharmakologie“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. H. H. Radeke und Frau Prof. Dr. B. Süß durchgeführt. In Kooperation mit Herrn Prof. Dr. med. H. Burkhardt und nach Unterweisung von Frau Dr. med. M. Köhm (Universitätsklinikum Frankfurt, Medizinischen Klinik II, Rheumatologie) wurden die Patienten rekrutiert, Blutproben und Hautbiopsien gesammelt und eigenständig die Kapillarmikroskopie durchgeführt. Die Kooperation mit dem Karolinska-Institut, Stockholm, wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Die aus der schwedischen Biomaterialbank erhaltenen Proben und die dazugehörigen epidemiologischen Daten wurden mit den deutschen Proben und Daten in der Arbeitsgruppe „Immunpharmakologie“ analysiert (u. a. molekularbiologische und zellkulturtechnische Arbeiten, Korrelationsanalysen, MELK). Für die LC-MS/MS-Messung der Sphingolipide wurden die Proben intern aufbereitet und in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. med. Geisslinger (Institut für klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Frankfurt) gemessen. Die anschließende Aufbereitung der Rohdaten erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H. H. Radeke. Ein Ausschnitt dieser Ergebnisse ist nachfolgend dargestellt.

7.1. Klinische Daten der SSc-Patienten- und Vergleichskollektive

Für die klinische Diagnostik der Sklerodermie stehen bislang keine validierten Biomarker, außer postulierte und erst spät in der Pathogenese auftretenden Auto-Antikörpern, zur Verfügung. Zeitgleich ist in der Forschung - vor allem zur Optimierung der Diagnostik und der Therapie der Patienten - eine starke Tendenz zur Evaluation potentieller diagnostischer oder prognostischer Biomarker zu sehen. Grundlage dieser Arbeit ist die Analyse serologisch nachweisbarer Moleküle bezüglich ihrer Funktion als Biomarker zur Früherkennung der Systemischen Sklerose. Dies geschah in Serum- und Plasmaproben von SSc-Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsdauer und entsprechenden Kontrollgruppen. Während es bereits vereinzelte deskriptive Studien gibt, die eine Auswahl der Sphingolipiden oder die IL-33/ST2 bei SSc-Patienten untersucht haben, blieb eine umfassende Untersuchung beider Signalwege in Bezug auf die anfängliche Endothelzellschädigung bislang aus. Sowohl ein erhöhter S1P-Spiegel (142) als auch eine erhöhte Konzentration von IL-33 konnte im Serum von kleinen SSc-Patientenkollektiven (184) nachgewiesen werden. ST2 wurde ausschließlich in SSc-Hautbiopsien als ST2L, die membrangebundene Form des IL-33-Rezeptors untersucht (169).

Im Hinblick auf das frühzeitig präsente Raynaud-Phänomen und die damit einhergehenden vaskulären Veränderungen wurden bisher weder die Rolle IL-33, noch die der Sphingolipide in der Sklerodermie erörtert. Dabei gibt es erste interessante Befunde, die auf eine Beteiligung beider Signalwege sowohl bei der initialen EC-Schädigung als auch bei der beginnenden Fibrose hindeuten. So wird den Sphingolipiden, insbesondere S1P, über ihre Membranfunktion hinaus eine immerzu wichtigere Rolle als bioaktives Signalmolekül zugeschrieben (206, 207). Wie bereits in der Einleitung näher beschrieben, verstärkt S1P zusammen mit TGF- β die Kollagen-Expression in Myofibroblasten diverser Organe (128–130). In der idiopathischen Lungenfibrose steigert es zusätzlich die Transition von Epithelzellen hin zu Myofibroblasten (134). Im vaskulären Bereich ist S1P für den Erhalt der EC-Barrierefunktion unerlässlich (153–155, 208). Während die Stärkung der EC-Barrierefunktion über die Aktivierung des S1P1-Rezeptors abläuft, bewirkt die Bindung von S1P an den S1P2-Rezeptor eine Inhibition der Angiogenese (158).

Eine ähnliche Interaktion wie zwischen S1P und TGF- β scheint zwischen dem IL-33/ST2- und S1P/S1PR-Signalweg zu bestehen. Das S1P-Analoga Fingolimod inhibiert die IL-33/ST2-Achse via PP2A (209). IL-33 selbst ist hinlänglich als Alarmin bekannt (182). Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit sowohl die Sphingolipide S1P, dhS1P als auch Sphingosin und das Alarmin IL-33 mit seinem zugehörigen Rezeptor ST2 gemeinsam und systematische in einem definierten SSc-Patientenkollektiv untersucht.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden ausgewählte klinische und hämatologische Daten sowie der Kapillarstatus der SSc-Patienten erfasst. Weiterhin wurden mögliche Komorbiditäten vermerkt. Da die Sklerodermie durch eine stark heterogene klinische Präsentation gekennzeichnet ist, war die Erfassung der zuvor aufgeführten Parameter entscheidend für die spätere Subgruppierung der SSc-Patienten und die darauf basierend durchgeführten Korrelationsanalysen. Nach diesen anfänglichen Erhebungen wurden in der ersten Rekrutierungsphase Serumproben der Patienten und Probanden sowohl in Frankfurt als auch in Stockholm gewonnen und aufgearbeitet. In der Rekrutierungsphase 2 wurden Plasmaproben in der Frankfurter Sklerodermie-Sprechstunde gewonnen und eine umfangreiche Kohorte von SSc-Patienten aus der Biomaterialbank des Karolinska-Instituts (Schweden) untersucht.

7.1.1. Allgemeine Parameter

Patienten aus der Sklerodermie-Sprechstunde in Frankfurt wurde bei Einschluss in die diagnostische Studie Blut (Plasma oder Serum) entnommen und auf folgende laborchemische Parameter untersucht: C-reaktives Protein (CRP; Entzündungsparameter) und Kreatinin (Nierenretentionsparameter) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

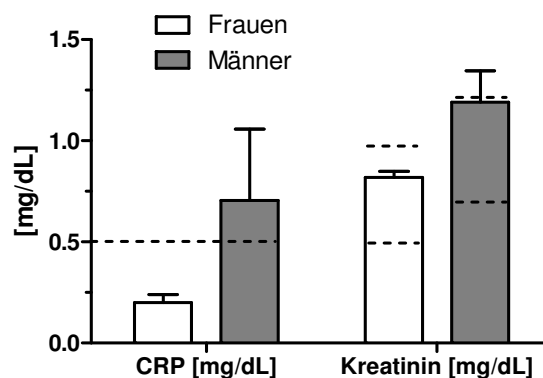


Abbildung 12: CRP- und Kreatinin-Serumkonzentrationen aller lcSSc-Patienten des Frankfurter Kollektiv vgl. Referenzbereich sind für a) CRP < 0,50 mg/dl, Alter 15 bis 199 Jahre und b) Kreatinin: Männer 0,70 - 1,20 mg/dl und Frauen 0,50 - 0,90 mg/dl, Alter 15 bis 199 Jahre. Die Referenzbereiche sind jeweils als unterbrochene Linie dargestellt.

Der Referenzbereich für CRP für Frauen und Männer liegt bei unter 0,5 mg/dl. Die Patienten 4, 7, 10 und 14 weisen erhöhte CRP-Werte auf, wobei bei den weiblichen Patient 4, 10 und 14 keine diagnostisch-gesicherte, akute Entzündung zum Untersuchungszeitpunkt vorlag. Die erhöhte CRP-Serumkonzentration des männlichen Patienten 7 ist am ehesten auf eine erosive Arthritis zurückzuführen.

Für Kreatinin im Serum ist der Referenzbereich für Frauen 0,5 bis 0,9 mg/dl, während er für Männer zwischen 0,7 und 1,2 mg/dl liegt. Ein erhöhter Kreatinin-Wert weist auf eine Nephropathie, unter Umständen auch auf eine Verletzung der Haut und Muskulatur hin. Bei folgenden Patienten (24,1 %) konnte zum Blutentnahmezeitpunkt ein erhöhter Kreatinin-Spiegel im Serum nachgewiesen werden: 4, 6 bis 8, 23, 26 und 27.

Da die S1P-Speicherung und -Bereitstellung mittels Erythrozyten essentiell für die Stabilität des vaskulären Plexus und die vaskuläre Umgestaltung, u. a. während der embryonalen Entwicklung, ist (210), wurden die Anzahl der Erythrozyten analysiert (Abbildung 13). Um akute Infektionen oder Virusinfektionen auszuschließen, wurde die

Leukozytenzahl bestimmt. Keiner der Patienten zeigte veränderte Erythrozyten- oder Leukozyten-Parameter.

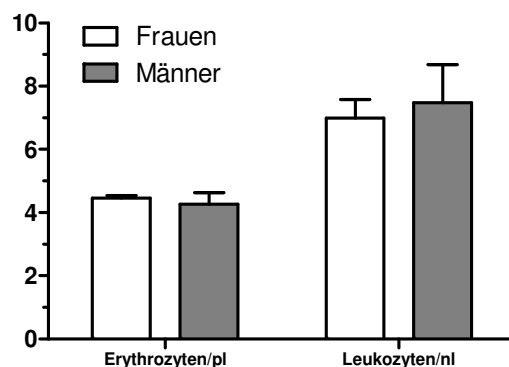


Abbildung 13: Erythrozyten- und Leukozyten-Konzentration im Blut der lcSSc-Patienten der Frankfurter Kohorte. NT-pro-BNP, N-terminale-pro-Brain-natriuretic peptide (N-terminale Proform des natriuretisches Peptids aus dem Gehirn). Die Referenzbereiche sind wie folgt: a) Erythrozyten: Männer 4,6 bis 6,0/pl, Frauen 3,9 bis 5,2/pl bei einem Alter von 18 bis 99 Jahren; b) Leukozyten: Männer 4,0 bis 10,4/nl, Frauen 4,2 bis 9,07/nl bei einem Alter von 21 bis 99 Jahren.

Die Medikation der Sklerodermie-Patienten ist heterogen und symptom-orientiert. Eine immunsuppressive Therapie erhielten 37,7 % der Patienten (Predinon, Azathioprin, Methothrexat). Bei den schwedischen Patienten bekamen 38,7 %, bei den deutschen Patienten 36,7 % Immunsuppressiva. Eine vasodilatorische Therapie wurde bei 24,5 % der schwedischen und 30,8 % der deutschen Patienten durchgeführt. Häufig wurden zur Reduktion unerwünschter Wirkungen anderer Pharmaka auch Protonenpumpenhemmer (Omeprazol, Pantozol) eingenommen (Karolinska-Kohorte: 46,9%, Frankfurter Kohorte: 23 %). Nach der Primärdiagnose der Sklerodermie, wurde eine Hypertonie medikamentös behandelt (Frankfurter Kohorte 26,9 %, Karolinska-Kohorte 18,4%; eingesetzte Präparate: Plendil, Enalapril, Catopril, Ramipril). Andere behandelte Erkrankungen waren mit der Sklerodermie einhergehende Depressionen und Schmerzen. Zusätzlich nahmen einigen Patienten blutverdünnende Medikamente ein (ASS, Marcumar).

7.1.2. SSc-spezifische Daten, Diagnosestellung und Therapiestatus

7.1.2.1. Kapillarmikroskopische Befunde

Exemplarisch wurden drei gesunden Probanden, elf Patienten mit primärem Raynaud Phänomen sowie 26 lcSSc-Patienten aus der Frankfurter Kohorte vor Ort auf ihren Kapillarstatus untersucht. Die quantitative Auswertung der Veränderungen in dem Kapillarbett der genannten Gruppen ist in Abbildung 14 dargestellt.

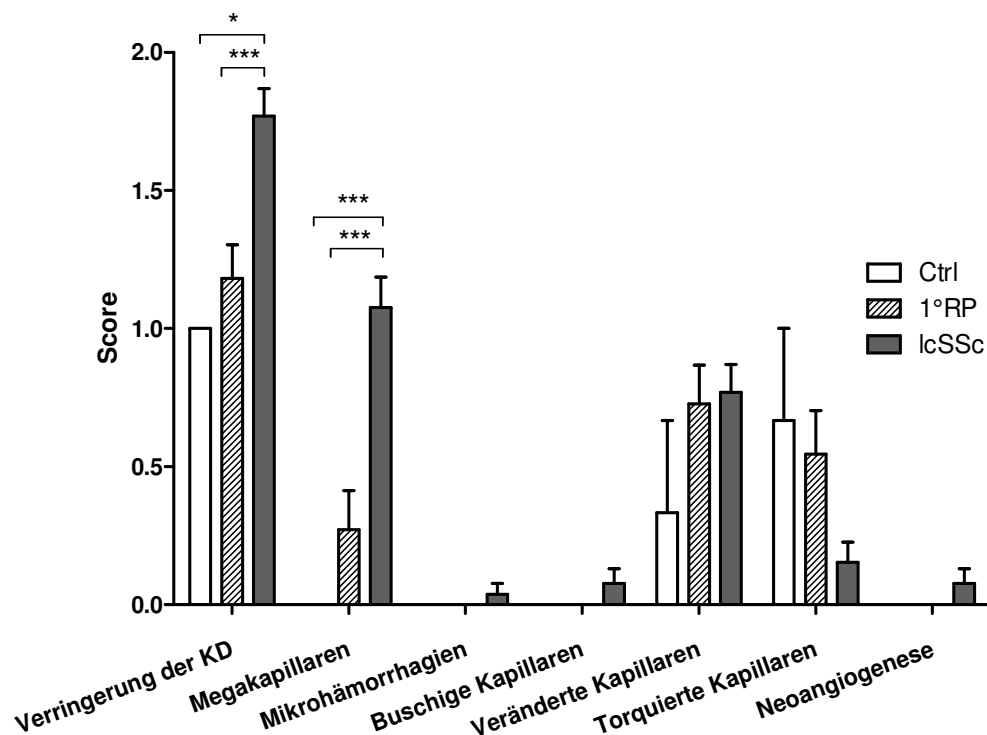


Abbildung 14: Quantitative Auswertung der kapillarmikroskopischen Untersuchung der Frankfurter lcSSc-Patienten (graue Säulen; n = 26), 1.RP-Patienten (karierte Säule; n = 11) und gesunder Probanden (weiße Säulen; n = 3). Folgende Charakteristika wurden nach (211), ausgewertet: Verringerung der Kapillardichte, Anzahl an Megakapillaren, Mikrohämorrhagien, buschigen Kapillaren, veränderten Kapillaren, torquierte Kapillaren und neoangiogenetische Veränderungen pro Millimeter. Zur statischen Auswertung wurde der *Two Way* ANOVA verwendet (*p = 0.05; ***p ≤ 0.001).

Bei den lcSSc-Patienten zeigte sich eine deutliche Abnahme der Kapillardichte sowohl im Vergleich zu den gesunden Probanden als auch zu den Patienten mit primärem Raynaud Phänomen. Ferner weisen die Patienten mit lcSSc verglichen mit beiden Kontrollgruppen eine signifikant höhere Anzahl an Megakapillaren auf. Bei den 1.RP-Patienten konnte unerwarteter Weise in vier Patienten vereinzelte Megakapillare gefunden werden. Torquierte Kapillaren lagen in allen untersuchten Gruppen vor. Veränderte oder buschige Kapillaren und Neoangiogenese zeigten – möglicherweise passend zu dem gesteigerten endothelialen Umbau - ausschließlich lcSSc-Patienten.

In Abbildung 15 sind beispielhaft, an je einem Individuum, die Sklerodermie-typischen Veränderungen im Kapillarmuster im Verlauf der lcSSc dargestellt. Im frühen Stadium zeigte sich die Etablierung vermehrter Megakapillaren, die im aktiven Stadium zu Einblutungen in das Gewebe des Nagelfalzes führten. Ebenso war eine deutlich verringerte Kapillardichte bei den SSc-Patienten im Vergleich zu den Kontrollindividuen feststellbar.

Zu den spezifischen Merkmalen des späten Stadiums zählt unter anderem die Neoangiogenese. Diese wird in Abbildung 15, unteres rechtes Bild in der Kapillare am linken Bildrand deutlich.

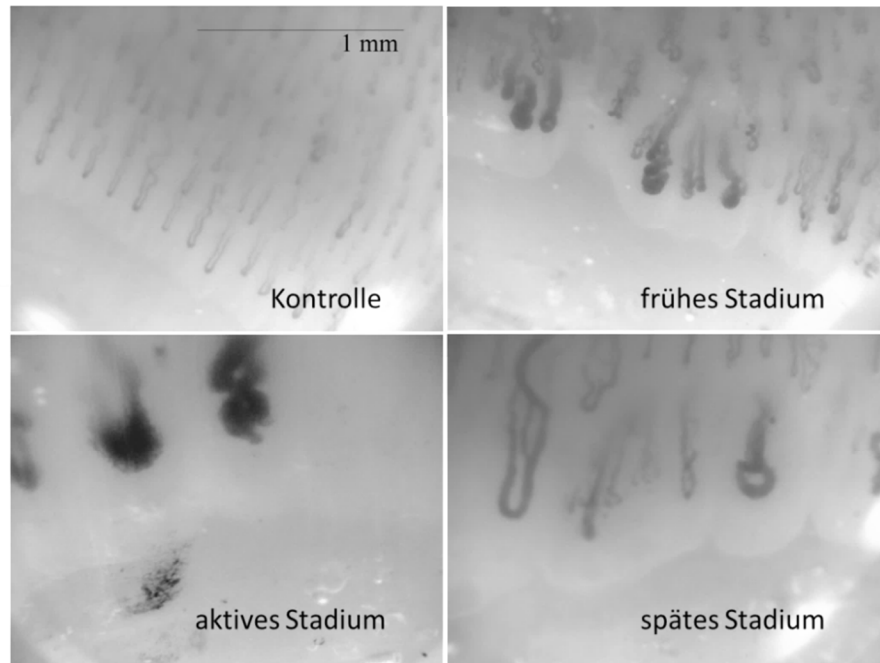


Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung des frühen, aktiven und späten Stadiums der Kapillarveränderungen in der IcSSc per Nagelfalz-Videokapillaroskopie (Vergrößerung 250-fach) im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Links oben, Darstellung der Kapillarstruktur eines gesunden Probanden. Rechts oben, Darstellung eines IcSSc-Patienten mit den ersten Veränderungen im Kapillarmuster (Megakapillare). Links unten, Darstellung des aktiven Stadiums mit deutlich sichtbaren Megakapillaren und Mikrohämorrhagie. Rechts unten, Darstellung der späten Kapillarveränderung in der IcSSc (Verringerung der Kapillardichte, Neoangiogenese).

Die Patienten der Stockholmer Kohorten (Serumproben) wurden ausschließlich in die drei Stadien der Kapillarveränderungen unterteilt. Die Auswertung und der Vergleich mit der Patientenkohorte aus Frankfurt sind in Tabelle 10 dargestellt. Während für die Stockholmer Patienten (Plasmaproben) keine Angaben zu dem Kapillarstatus vorlagen.

Tabelle 10: Kapillarmikroskopischer Status der Stockholmer Kohorte im Vergleich zu den Frankfurter lcSSc-Patienten.

Kapillarstatus		früh	aktiv	spät
FFM Kohorte		13	9	1
Stockholmer Kohorte	LeRoy	0	6	4
	(1 - 3 J.)	2	7	4
	(4 - 9 J.)	0	5	6
	(> 9 J.)	0	2	8
	dcSSc	1	6	9

7.1.2.2. Autoantikörper-Status der Patienten

Zusätzlich zu den in 7.1.1 genannten Laborparametern wurde der Autoantikörperstatus in allen Serumproben der SSc-Patienten erhoben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Bei den Patienten mit limitierter Sklerodermie war über den Beobachtungszeitraum (ein bis mehr als neun Jahre) im Durchschnitt eine prozentuale Abnahme der Autoantikörper, speziell aber für die extrahierbaren nukleären Antikörper und Anti-Scl70-Antikörper nachweisbar. Während für dcSSc-Patienten eine hohe Prävalenz von Anti-Scl70-Antikörpern beschrieben ist (78) und in den vorliegenden Serumproben gezeigt werden konnte, zeigten sich erhöhte Anti-Scl70-Antikörpertiter ebenso bei LeRoy-Patienten und lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von weniger als drei Jahren. Anti-Nukleäre-Antikörper wiesen mehr als 60 % der lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von über vier Jahren sowie jeweils 100 % der LeRoy-, dcSSc- und der verbleibenden lcSSc-Patienten auf.

Tabelle 11: Autoantikörperstatus im Serum der lcSSc-Patienten im Vergleich zu den dcSSc-Patienten (gemischte Kohorte).

	LeRoy	lcSSc (1-3 J.)	lcSSc (4-9 J.)	lcSSc (> 9 J.)	dcSSc
n	10	15	23	29	20
ANA ⁺ , n (%)	10 (100)	15 (100)	14 (60,9)	26 (89,7)	20 (100)
ENA ⁺ , n (%)	10 (100)	11 (73,3)	12 (52,2)	1 (5,3)	18 (90)
Anti-Cenp B ⁺ , n (%)	10 (100)	11 (73,3)	7 (30,3)	16 (55,2)	17 (85)
Anti-Scl70 ⁺ , n (%)	0 (0)	11 (73,3)	10 (43,5)	1 (5,3)	12 (65)

ANA, antinukleäre Antikörper; ENA, extrahierbare nukleäre Antikörper; Anti-Cenp B, Centromerprotein-B-Antikörper; Anti-Scl70, Anti-DNA-Topoisomerase I Antikörper; LeRoy, Patienten klassifiziert nach LeRoy Kriterien mit einer Frühform der Systemischen Sklerose; lcSSc, limitierte Systemische Sklerose; dcSSc, diffuse Systemische Sklerose; J, Jahre.

7.1.2.3. Komorbiditäten der Patienten

Alle Sklerodermie-Patienten von denen Serumproben entnommen wurden, wurden auf das Vorliegen folgender SSc-typischer Begleiterkrankungen anhand der Patientenunterlagen analysiert: präsente digitale Ulzerationen (DU), Calcinosis cutis, erosive Arthritis, pulmonal-arterielle Hypertonie und interstitielle Lungenerkrankung (ILD). In Tabelle 12 ist dargestellt, dass dcSSc-Patienten und lcSSc-Patienten (1-3 J.) am häufigsten als Begleiterkrankung die ILD aufweisen (55 % bzw. 46,7 %). Nach der ILD kommen am zweithäufigsten mit 4,3 % bis 13,3 % die erosive Arthritis und mit 10,7 bis 15 % die Calcinosis cutis in allen Patientengruppen vor. Für viele SSc-Patienten wurden im Verlauf der Krankengeschichte digitale Ulzerationen beschrieben, jedoch waren nur bei zwei dcSSc-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme DU präsent.

Tabelle 12: Kormobiditäten der lcSSc-Patienten im Vergleich zu den dcSSc-Patienten.

	LeRoy	lcSSc (1 - 3 J.)	lcSSc (4 - 9 J.)	lcSSc (> 9 J.)	dcSSc
n	10	15	23	29	20
Präsente DU, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,4)	2 (10)
Calcinosis cutis, n (%)	1 (10)	2 (13,3)	0 (0)	8 (27,6)	3 (15)
Arthritis, n (%)	0 (0)	2 (13,3)	1 (4,3)	5 (17,2)	1 (5)
PAH, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (13,8)	0 (0)
ILD, n (%)	0 (0)	7 (46,7)	9 (39,1)	0 (0)	11 (55)

DU, digitale Ulzerationen; PAH, pulmonale-arterielle Hypertonie; ILD, interstitielle Lungenkrankheit; LeRoy, Patienten klassifiziert nach LeRoy Kriterien mit einer Frühform der Systemischen Sklerose; lcSSc, limitierte Systemische Sklerose; dcSSc, diffuse Systemische Sklerose; J, Jahre.

7.2. Proteinanalytik des SSc-Patientenserums mit Fokus auf IL-33 und seinen Rezeptor ST2

Nach Abschluss der Charakterisierung der SSc-Patienten wurde das Serum der Frankfurter und der Karolinska-Kohorte auf den Gehalt des Alarmins IL-33 und dessen Rezeptor ST2 untersucht. Wie von Yanaba *et al.* (184) und Vettori *et al.* (19) in wenigen SSc-Patienten gezeigt wurde, ist IL-33 im Serum verglichen mit gesunden Probanden deutlich erhöht. Diese Ergebnisse sollte in der vorliegenden Arbeit in einer größeren als der bei Yanaba verwendeten SSc-Kohorte bestätigt werden. Für den membrangebundenen IL-33-Rezeptor ST2 wurde bereits eine veränderte Expression in und eine verringerte Repräsentation auf Endothelzellen im Gewebe von SSc-Patienten nachgewiesen. In dieser klinischen Untersuchung lag das Ziel in der Messung von sST2, der zirkulierenden, löslichen Isoform des IL-33-Rezeptors, die anders als die lokale zelluläre Expression entscheidend für die Bioaktivität ist, im Serum in lcSSc-Patienten.

7.2.1. Serum-sST2 ist abhängig von der Erkrankungsdauer erhöht bei lcSSc-Patienten

Zirkulierendes IL-33 und sST2 wurde per ELISA in humanen Sera analysiert. Die photometrische Auswertung zeigte erhöhte sST2-Serumspiegel für lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 9 Jahren (Abbildung 16). Die sST2-Konzentration

dieser Patientengruppe war im Vergleich zu Patienten mit einer kürzeren Erkrankungsdauer oder Patienten mit der diffusen Form der Sklerodermie signifikant erhöht (LeRoy $0,0 \pm 0,0$ pg/ml vgl. lcSSc (> 9 Jahre) $1391,0 \pm 4631,0$ pg/ml, $p \leq 0,001$; lcSSc (1 bis 3 Jahre) $77,16 \pm 204,0$ pg/ml vgl. lcSSc (> 9 Jahre) $1391,0 \pm 4631,0$ pg/ml, $p \leq 0,01$; dcSSc $50,64 \pm 120,4$ pg/ml vgl. lcSSc (> 9 Jahre) $1391,0 \pm 4631,0$ pg/ml, $p \leq 0,01$). Des Weiteren korrelierte der sST2-Serumspiegel deutlich mit der Erkrankungsdauer der LeRoy- und lcSSc-Patienten beider Kohorten (Patientenanzahl: 77; Spearmans Rho: $\rho = 0,3916$, $p = 0,0004$).

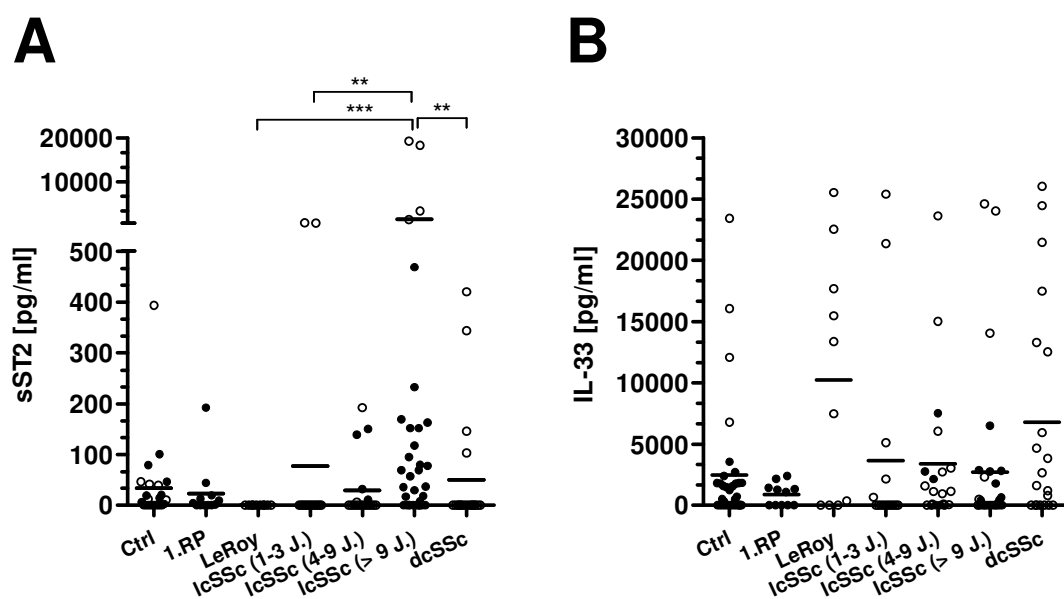


Abbildung 16: (A) sST2- und (B) IL-33-Serumspiegel der unterschiedlichen SSc-Patienten- und Kontrollgruppen. Die per ELISA erhobenen sST2- und IL-33-Serumkonzentrationen sind für alle Patienten mit systemischer Sklerose, 1.RP-Patienten und gesunde Individuen dargestellt. Abgebildet sind Patienten aus dem Karolinska- und dem Frankfurter Kollektiv (LeRoy $n = 10$, lcSSc (1-3 J.) $n = 15$, lcSSc (4-9 J.) $n = 18$, lcSSc (> 9 J.) $n = 29$, dcSSc $n = 20$), gesunden Probanden ($n = 34$) und die 1.RP-Patienten ($n = 11$). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Alle Werte wurden als Doppelwert erhoben. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe sind als Balken dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Vergleichende Untersuchung der IL-33-Konzentrationen im Serum von SSc-Patienten und gesunden Probanden ließen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden feststellen. Der für die dcSSc- und die LeRoy-Patienten erhobene, erhöhte IL-33-Mittelwert war nicht signifikant verglichen mit den Kontrollgruppen (dcSSc: 6803 ± 8996 pg/ml; LeRoy: 10250 ± 9991 pg/ml; gesunde Individuen: 2472 ± 5057 pg/ml). Die IL-33-Serumkonzentrationen korrelierten bei den LeRoy- und den lcSSc-Patienten nicht mit der Dauer der Erkrankung (Patientenanzahl: 77; Spearmans Rho: $\rho = 0,1926$, $p = 0,1897$).

Zusammenfassend konnten die, in der Literatur beschriebenen, Ergebnissen hinsichtlich IL-33 nicht bestätigt werden. Dafür konnte gezeigt werden, dass die sST2-Serumkonzentration ausschließlich bei lcSSc-Patienten mit einer längeren Erkrankungsdauer signifikant erhöht ist.

7.2.2. Nachweis von erhöhtem Serum-sST2 bei deutschen lcSSc-Patienten mittels Proteinarray

Der im vorangegangenen Abschnitt erbrachte Nachweis über erhöhtes sST2 im Serum von lcSSc-Patienten, wurde zur Bestätigung im Rahmen eines Proteinarrays auf Western-Blot-Basis überprüft. Alle getesteten lcSSc-Patienten hatten eine Krankheitsdauer von $11 \pm 6,81$ Jahren. Es handelte sich um drei weibliche und einen männlichen Patient mit einem Altersdurchschnitt von $54,5 \pm 5,60$ Jahren (Alter der gesunde Probanden: $52,50 \pm 6,81$ Jahren). Es zeigte sich, dass sST2 in drei von vier lcSSc-Patienten (P2, P3, P4) im Vergleich zu dem jeweiligen alters- und geschlechtsentsprechender gesunden Probanden im Serum erhöht ist (Abbildung 17).

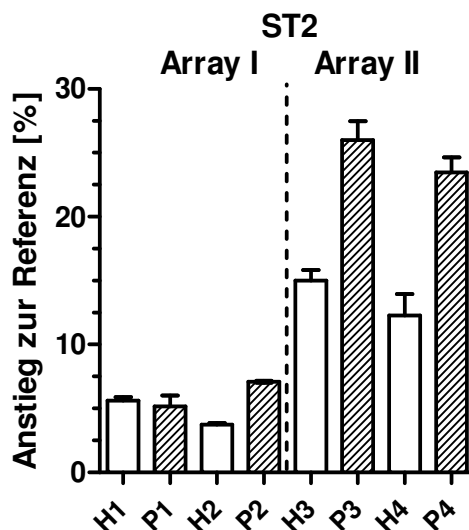


Abbildung 17: Auswertung der Signalintensität des Proteinarrays für ST2. Es wurden zwei Arrays zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt (Array I und II). Bei jedem Array wurde jeweils Serum von zwei gesunde Probanden (*healthy*, H) und zwei lcSSc-Patienten (*patient*, P) analysiert. Für jedes Individuum wurde das Signal im Doppelwert gemessen. Die erhaltenen Signale wurden anhand der auf jeder Membran vorhandenen Referenz normiert. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Diese Daten stärken die Resultate aus 7.2.1, die eine Erhöhung von sST2 im Serum von lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als neun Jahren zeigen. Sie machen

ebenso deutlich, dass viele, jedoch nicht alle lcSSc-Patienten in diesem späten Krankheitsstadium einen erhöhten sST2-Serumspiegel aufweisen.

7.3. Massenspektrometrische Analyse der Sphingolipid-Profile in SSc-Patienten

Die nachfolgenden Ergebnisse stellen die Sphingolipid-Analyse per LC-MS/MS der schwedischen und der deutschen SSc-Patientenkohorte und der entsprechenden Kontrollkollektiven dar.

Das Sphingolipidmuster wurde untersucht, da es sowohl erste *in vivo* als auch *in vitro* Hinweise auf eine Beteiligung der Sphingolipide an der Pathogenese der SSc gab. So konnte Tokumura in zehn SSc-Patienten zeigen, dass S1P deutlich im Serum derselben erhöht ist (142). S1P wirkt in Leber und Niere pro-fibrotisch in dem es den TGF- β -Signalwegs verstärkt (129, 130). Dihydro-S1P hingegen hemmt die Kollagensynthese durch den PTEN/Smad3-Signalwegs und wirkt daher anti-fibrotisch (139). Diese Befunde weisen auf eine frühe Beteiligung der Sphingolipide in der Pathogenese der SSc hin. Eine möglichst zeitige Involvierung der Sphingolipide in die pathologischen Vorgänge der SSc, prädestinieren diese als mögliche frühdiagnostische Marker. In den nachfolgenden Abschnitten ist zuerst die Analyse der Serum- und anschließend der Plasmaproben beschrieben. Zur Vereinfachung der Abbildungen sind, sofern nicht anders beschrieben, die schwedischen als unausgefüllte und die deutschen Patienten und Probanden als schwarze Kreise gezeigt.

7.3.1. Überprüfung der analytischen Methode

In jeder Messreihe wurde zur Berechnung der Sphingolipid- sowie Ceramidkonzentrationen eine Standardreihe erstellt. Diese Reihe bestand aus 15 unterschiedlich konzentrierten, standardisierten Proben (Standards) (siehe 6.1.5). In jeder Messung wurde mittels ausgewählter Standards ebenso die Qualität der Messung überprüft. Dafür wurden ausgewählte Standards (zumeist Standard 9 mit 15 ng/ml S1P sowie dhS1P) im Duplikat (Standard und Qualitätskontrolle) extrahiert und einmal im Rahmen der Standardreihe und das zweite Mal zwischen den extrahierten Patientenproben gemessen.

Zur Untersuchung der Präzision der verwendeten Methode wurde der Interassay-Variationskoeffizient parallel zu der Erstellung des Sphingolipid-Profils der SSc-

Serumproben anhand von Standard und Qualitätskontrolle überprüft. In 14 Messungen wurde anhand des Mittelwerts der Resultate des Standard- und Qualitätskontrollenwerts der Interassay-Variationskoeffizient berechnet. Er betrug für S1P 6,33 % und für dhS1P 6,74 %.

7.3.2. Analyse der Serum-Sphingolipidspiegel in schwedischen und deutschen Individuen

Um mögliche Unterschiede zwischen dem Frankfurter und dem Karolinska-Kollektiv zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Sphingolipidmessung getrennt nach dem jeweiligen Kollektiv aufgetragen (Abbildung 18). Dabei zeigte sich zwischen den gesunden Individuen der Kontrollgruppe beider Kohorten ein deutlicher Unterschied im S1P- und dhS1P-Serumspiegel. Der Mittelwert der S1P-Konzentration lag bei den schwedischen gesunden Individuen bei $1425,0 \pm 249,4$ nM während Serum der deutschen Probanden im Mittel $288,6 \pm 138,9$ nM S1P enthielt. Ebenso war der dhS1P-Spiegel um das bis zu 7,6-fache in den schwedischen Probanden erhöht (Deutsche Kontrollgruppe: $35,88 \pm 15,42$ nM; Schwedische Kontrollgruppe: $272,8 \pm 82,00$ nM).

In der schwedischen Kohorte (LeRoy-, lcSSc- und dcSSc-Patienten) zeigte sich kein Zusammenhang zwischen S1P, dhS1P sowie Sphingosin und der Krankheitsdauer (S1P: Patientenanzahl 78; Spearmans Rho: $\rho = -0,1392$, $p = 0,2242$; dhS1P: Patientenanzahl 78; Spearmans Rho: $\rho = -0,1213$, $p = 0,2901$; Sphingosin: Patientenanzahl 78; Spearmans Rho: $\rho = -0,02862$, $p = 0,8048$). Deutsche lcSSc-Patienten wiesen hingegen eine Korrelation zwischen dhS1P und der Erkrankungsdauer auf (Patientenanzahl: 50; Spearmans Rho: $\rho = 0,3759$, $p = 0,0071$). Ein deutlicher Zusammenhang bestand zwischen der S1P- sowie Sphingosin-Serumkonzentration und der Krankheitsdauer (Patientenanzahl jeweils 50; S1P: Spearmans Rho: $\rho = 0,4005$, $p = 0,0040$; Sphingosin: Spearmans Rho: $\rho = 0,4312$, $p = 0,0018$).

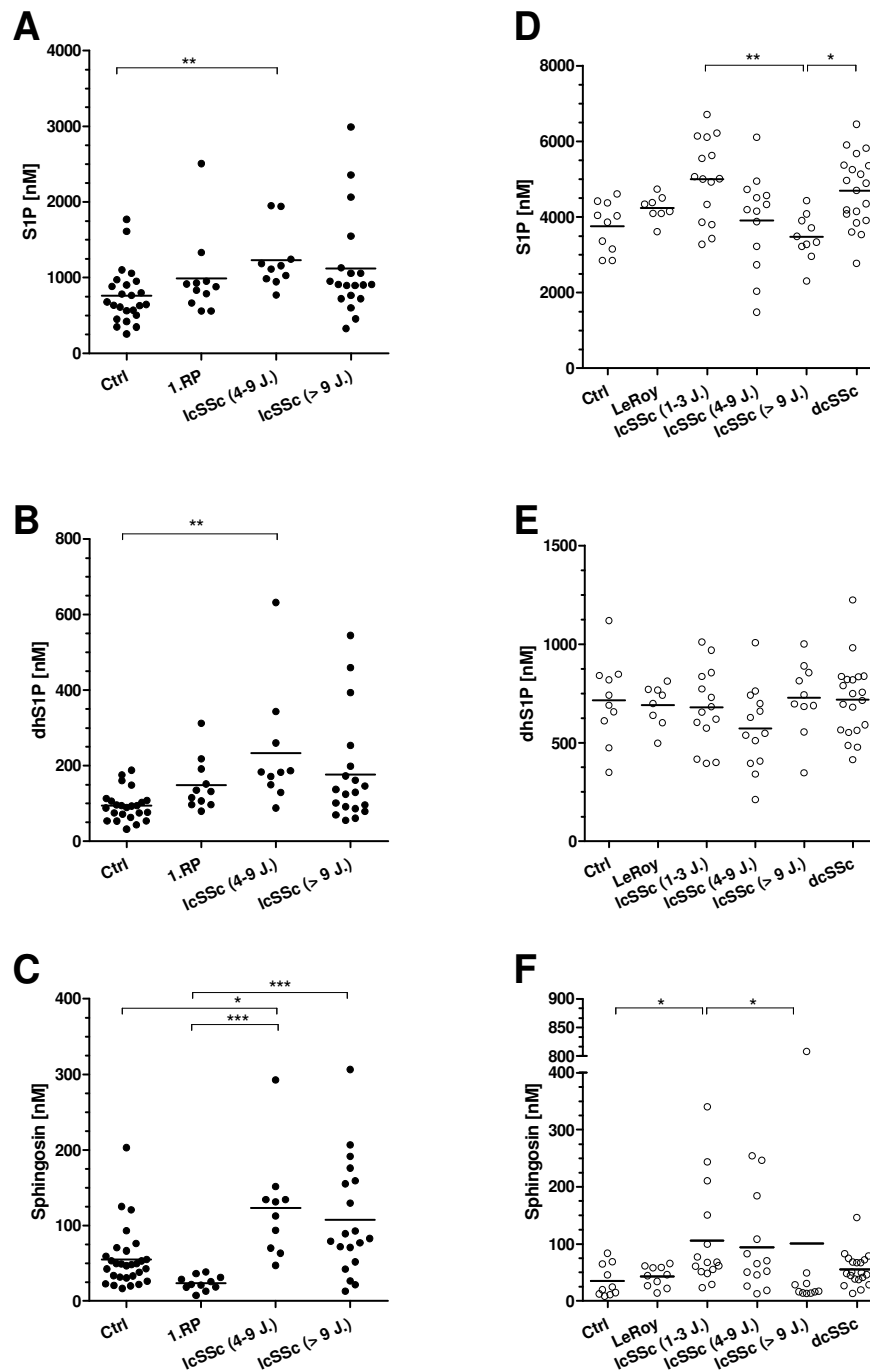


Abbildung 18: Einzelaufstellung der S1P-, dhS1P- sowie Sphingosin-Serumkonzentrationen der SSc-Patienten und Probanden (aus Abbildung 21). Die Patienten sind getrennt nach Karolinska- bzw. Frankfurter Kollektiv dargestellt („early SSc“-Patienten: LeRoy (n = 10); lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 1 bis 3 Jahren: lcSSc (1-3 J) (n = 15); lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 4 bis 9 Jahren: lcSSc (4-9 J) (n = 18); lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 9 Jahren: lcSSc (> 9 J) (n = 29); Patienten mit diffuser SSc: dcSSc (n = 20), gesunden Probanden (Ctrl) (n = 34) und die 1.Raynaud Phänomen-Patienten (1.RP) (n = 11). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. Analyse der jeweilig angezeigten Gruppe gegeneinander: *p = 0,05; **p < 0,01, ***p ≤ 0,001. (A) S1P-, (B) dhS1P- sowie (C) Sphingosin-Serumkonzentrationen der SSc-Patienten und Probanden des Frankfurter Kollektiv. (D) S1P-, (E) dhS1P- und (F) Sphingosin-Serumspiegel der SSc-Patienten und Probanden der Karolinska-Kohorte.

Ausschließlich die Sphingosin-Spiegel waren in den Individuen des Frankfurter und des Karolinska Kollektivs ähnlich ($16,52 \pm 11,74$ ng/ml vgl. $10,64 \pm 8,381$ ng/ml). Dabei zeigte sich, dass Sphingosine sowohl in der schwedischen als auch in deutschen lcSSc-Patienten signifikant erhöht war. Zur weiteren Untersuchung des S1P- und dhS1P-Unterschieds, wurden die gesunden Individuen beider Kohorten gleichzeitig auf ihren Gehalt an Ceramiden und wiederholt an Sphingolipiden per LC-MS/MS geprüft (Abbildung 20).

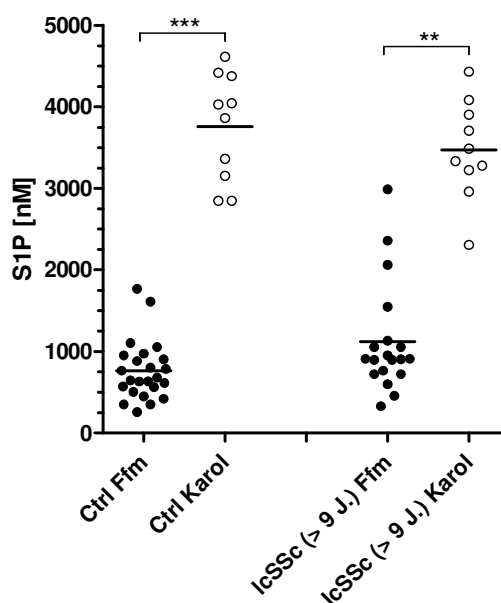


Abbildung 19: Vergleich der, per LC-MS/MS gemessenen, S1P-Serumspiegel der gesunden Probanden und der lcSSc-Patienten aus der Frankfurter und Karolinska-Kohorte. Der Vergleich der gesunden Individuen der Frankfurter Kohorte (Ctrl Ffm; n = 24) sowie der Karolinska-Kohorte (Ctrl Karol, n = 10) ist in der Abbildung links abgebildet. Rechts dargestellt sind entsprechend der jeweiligen Kohorte lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 9 Jahren (Ffm, Frankfurter Kohorte, n = 19; Karol, Karolinska-Kohorte, n = 10)). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Analyse der jeweilig angezeigten Gruppe gegeneinander: *p = 0,05; ***p ≤ 0,001.

Es wurden unterschiedliche Ceramide und Dihydroceramide auf ihr Vorkommen im Serum der gesunden Probanden analysiert. Beide, Ceramide als auch Dihydroceramide, sind die Zwischen- bzw. Ausgangsprodukte bei der Sphingosin-Biosynthese. Mit der Untersuchung der Serumspiegel sollte eine unterschiedliche Verteilung der Ceramide und Dihydroceramide als Ursache für die Unterschiede in den S1P- und dhS1P-Serumspiegeln ausgeschlossen werden.

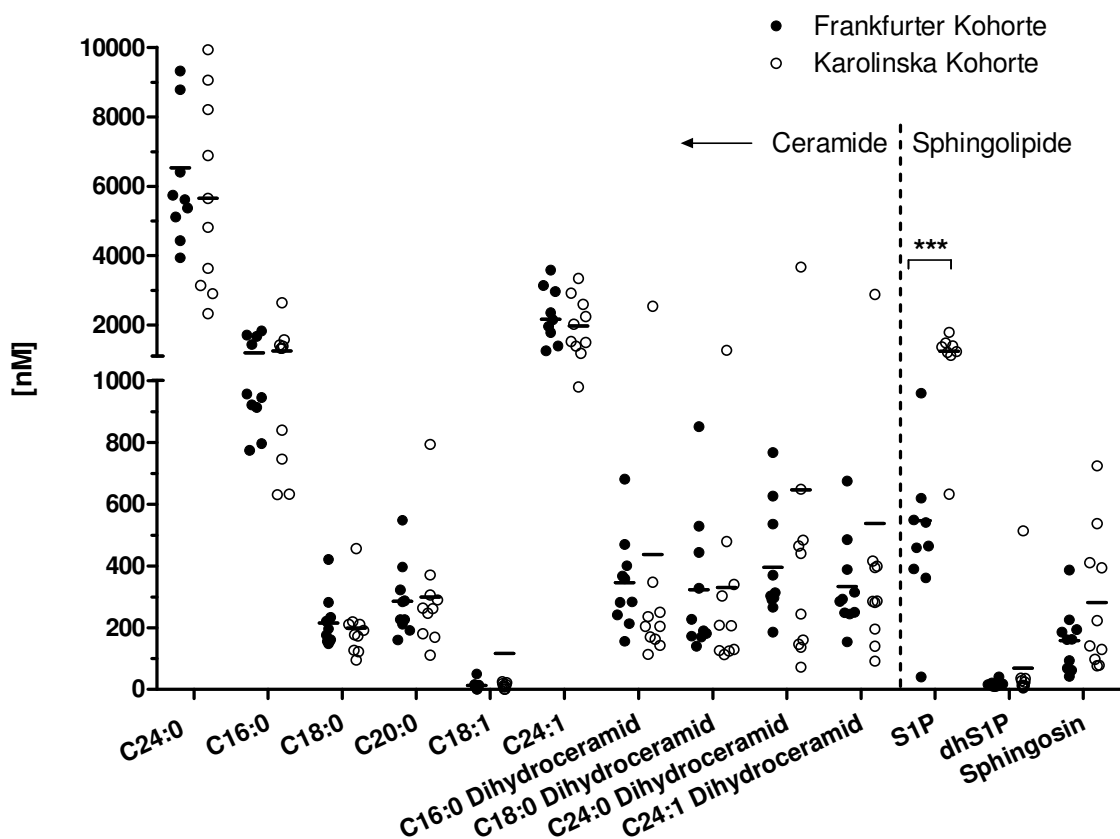


Abbildung 20: Ceramid- und Sphingolipid-LC-MS/MS-Analyse gesunder Probanden aus dem Karolinska- und dem Frankfurter Kollektiv (jeweils 10 Individuen pro Kohorte). Analysiert wurden Ceramide mit Fettsäurenketten unterschiedlicher Länge (Anzahl an Kohlenstoffatomen (C); Anzahl an Doppelbindungen pro Molekül erfolgt nach Anzahl der C-Atome getrennt durch einen Doppelpunkt; C24:0, C16:0, C18:0, C20:0, C18:1, C24:1) sowie Dihydroceramid mit unterschiedlich langen C-Atomketten (C16:0, C18:0, C24:0, C24:1). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. Analyse der jeweilig angezeigten Gruppe gegeneinander: *** $p \leq 0,001$.

Die Resultate der LC-MS/MS-Messung zeigten deutlich, dass die verschiedenen Ceramide und Dihydroceramide in den Serumproben der beiden Kohorten in ähnlichen, nicht signifikant unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen. Es konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Individuen des Frankfurter und des Karolinska-Kollektivs im S1P-Spiegel nachgewiesen werden (Frankfurt: $246,5 \pm 106,4$ ng/ml; Karolinska: $468,9 \pm 115,7$ ng/ml; $p = 0,003$; Abbildung 20). Die Sphingosin- und die dhS1P-Konzentration unterscheiden sich nicht zwischen den zwei Kohorten.

Insgesamt unterscheiden sich die Ceramid- und Sphingolipidspiegel der schwedischen und deutschen Kohorte nicht wesentlich voneinander. Ausschließlich S1P ist in den schwedischen Kontrollen derart erhöht, dass dies bei der Betrachtung der nachfolgenden Ergebnisse zu berücksichtigen ist. Parallel zur Fertigstellung dieser Dissertation wurde vergleichende Messungen von Serum- und Plasmaproben im schwedischen und deutschen

Kollektiv durchgeführt und eine darauf beruhende SOP (engl., *standard operation procedure*, Standardverfahrensweise) zur Serumgewinnung erstellt.

7.3.3. Sphingosin ist abhängig von der Erkrankungsdauer im Serum SSc-Patienten erhöht

Die in Abschnitt 7.3.2 dargestellten Sphingolipid-Serumprofile des Frankfurter und des Karolinska-Kollektivs wurden zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Patientengruppen und dem „zeitlichen“ Verlaufprofil der Sphingolipide auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollkohorte normiert (Abbildung 21).

In A bis C der Abbildung 21 wurden alle lcSSc-Patienten zu einer Gesamtpopulation der lcSSc-Patienten zusammengefasst. Dieser wurden die dcSSc- und die 1.RP-Patienten gegenübergestellt. Die Sphingosin-Serumkonzentrationen waren in dieser Gegenüberstellung als einzige signifikant in lcSSc- und dcSSc-Patienten im Vergleich zu den 1.RP-Patienten erhöht (lcSSc: $231,3 \pm 297,4$ %; dcSSc: $155,2 \pm 82,51$ %; 1.RP: $41,24 \pm 17,28$ %). Die S1P- und dhS1P-Serumspiegel waren in allen drei untersuchten Gruppen annähernd identisch (S1P: 1.RP: $118 \pm 64,92$ %; lcSSc: $122,6 \pm 52,21$ %; dcSSc: $122,1 \pm 24,52$ %; dhS1P: 1.RP: $137,6 \pm 45,73$ %, lcSSc: $136,2 \pm 110,5$ %; dcSSc: $100,6 \pm 26,74$ %). Dieser Befund bestätigte sich, wenn man die Patienten nach der Krankheitsdauer (LeRoy, „1 bis 3 Jahre“, „4 bis 9 Jahre“ sowie „über 9 Jahren“) gruppierte (Abbildung 21D bis F). Für die Sphingosin-Konzentrationen zeigte sich eine deutliche Erhöhung in den frühen Phasen der SSc („1 bis 3 Jahre“ und „4 bis 9 Jahre“), während das der Spiegel im weiteren Verlauf der Erkrankung wieder absinkt (Abbildung 21F).

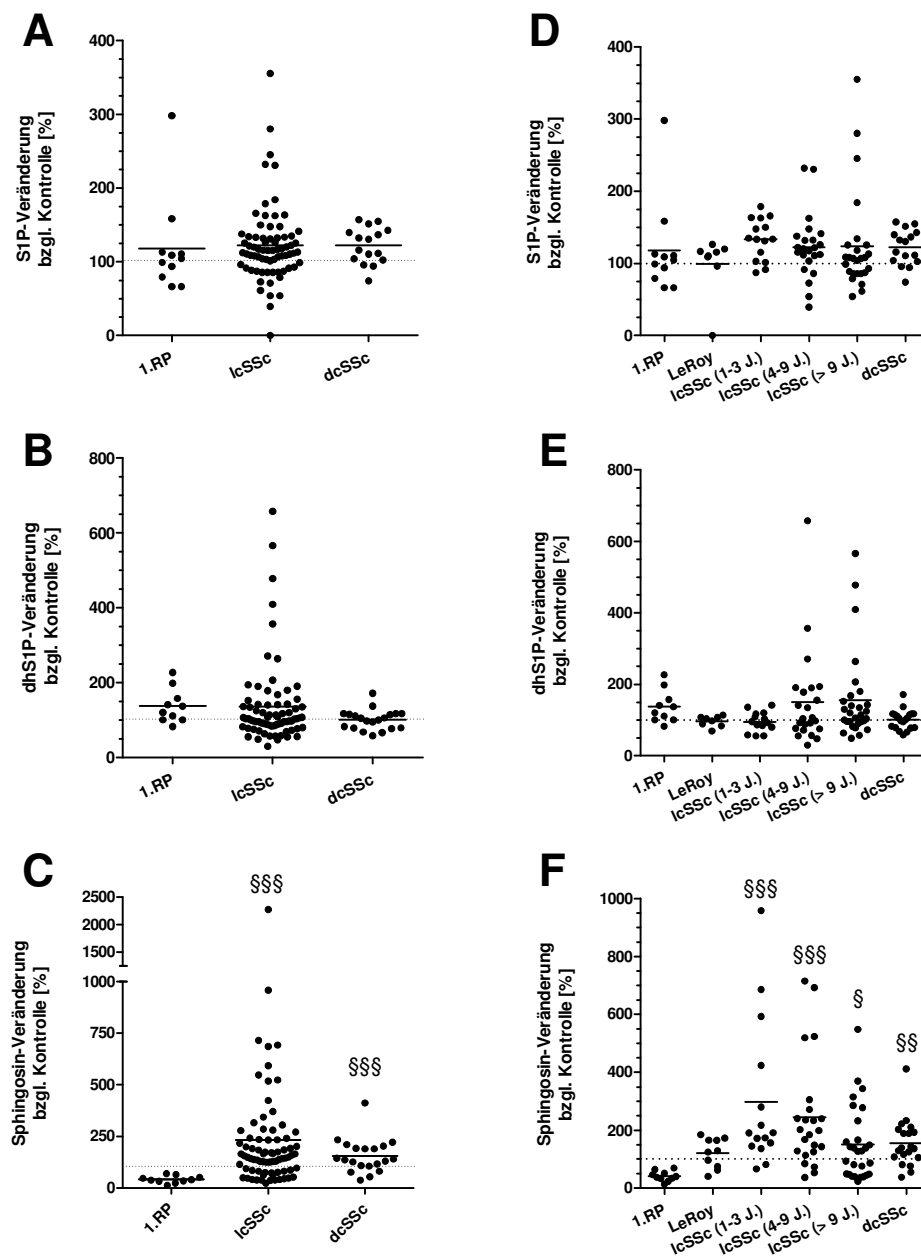


Abbildung 21: Resultate der S1P-, dhS1P- und Sphingosin-Serumspiegel-Messung der SSc-Patienten und der Kontrollgruppen. Die Serumkonzentrationen wurden auf den Mittelwert der Kontrollgruppe der jeweiligen Kohorte normiert. Schwedische und deutsche Individuen sind als ausgefüllte Kreise dargestellt. Normierte (A) S1P-, (B) dhS1P- und (C) Sphingosin-Serumspiegel der 1.RP-, aller lcSSc- und der dcSSc-Patienten. (D) bis (F): Dargestellt sind Patienten aus dem Karolinska- und dem Frankfurter Kollektiv („early SSc“-Patienten: LeRoy, n = 10; lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 1 bis 3 Jahren: lcSSc (1-3 J.), n = 15; lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 4 bis 9 Jahren: lcSSc (4-9 J.), n = 18; lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 9 Jahren: lcSSc (> 9 J.), n = 19; Patienten mit diffuser SSc: dcSSc, n = 20) und die 1.Raynaud Phänomen-Patienten (1.RP; n = 12). (D) Normierte S1P-, (E) dhS1P- und (F) Sphingosin-Serumspiegel der genannten SSc- und Kontrollgruppen. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe und als unterbrochene Linie der Mittelwert der gesunden Probanden beider Kollektive, der zur Vergleichbarkeit gleich 100 % gesetzt wurde. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. Die Paragraphen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den 1.RP Patienten an der jeweils markierten Gruppe (§ p = 0.05, §§ p ≤ 0.01, §§§ p ≤ 0.001).

Grundsätzlich konnten aufgrund der drastischen Unterschiede in den S1P- und dhS1P-Serumspiegeln zwischen der Frankfurter und Karolinska-Kohorte keine Differenz bezüglich der SSc-Patienten und den gesunden Probanden nachgewiesen werden. Sphingosin, welches in beiden Kollektiven ähnliche Konzentrationen in den Kontrollgruppen aufwies, lag anfangs deutlich im Serum der SSc-Patienten erhöht vor, während es im weiteren Verlauf der Sklerodermie zu einer Sphingosinabnahme kam.

7.3.4. Plasma-Sphingolipid-Profil einer zusätzlichen schwedischen lcSSc-Kohorte

Zur genaueren Untersuchung der in Abschnitt 7.3.3 nachgewiesenen Unterschiede in den Sphingolipid-Profilen der Frankfurter und der Karolinska Kohorte, wurden nachträglich Plasmaproben von 175 schwedischen lcSSc-Patienten und 112 schwedischen Probanden mittels LC-MS/MS auf ihren Sphingolipidgehalt analysiert. Bei diesen Proben wurden zusätzlich zu den bereits eingeführten Sphingolipiden S1P, dhS1P und Sphingosine, weitere Ceramide und Glucosyl-Ceramide untersucht. Eine genaue Aufstellung aller per LC-MS/MS-ermittelten Parameter findet sich in Tabelle 13.

Tabelle 13: Überblick der per LC-MS/MS analysierten Sphingolipide, Ceramide und Glucosyl-Ceramide der lcSSc-Plasmaproben.

Sphingolipide			Ceramide		Glucosyl-Ceramide	
-	S1P	-	C14:0-Ceramid	-	C16:0-Glucosyl-Ceramid	
-	dhS1P	-	C16:0-Ceramid	-	C24:1-Glucosyl-Ceramid	
-	Sphingosin	-	C18:0-Ceramid			
		-	C20:0-Ceramid			
		-	C24:0-Ceramid			
		-	C18:1-Ceramid			
		-	C24:1-Ceramid			
		-	C16:0-Dihydroceramid			
		-	C18:0-Dihydroceramid			
		-	C24:0-Dihydroceramid			
		-	C18:1-Dihydroceramid			

Die gewonnenen Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert und in den nachfolgenden Abbildung jeweils mit dem Mittelwert und dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) abgebildet.

Eine Untersuchung der Ceramide zeigte, dass das C18:0-Ceramid, C24:1-Ceramid sowie das C16:0-Dihydroceramid bei lcSSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen signifikant erhöht waren (C18:0-Ceramid: $p = 0,0497$; C24:1-Ceramid: $p = 0,0471$; C16:0-Dihydroceramid: $p = 0,0327$; Abbildung 22C, G, H). Die weiteren Ceramide unterschieden sich in dem untersuchten Kollektiv nicht zwischen den gesunden Kontrollindividuen und den lcSSc-Patienten.

Durchgängig zeigte sich bei dieser Ceramid-Analyse, dass nur einzelne „Ceramidetypen“ (C18:0-, C24:1-Ceramid und C16:0-Dihydroceramid) im Plasma der schwedischen lcSSc-Patienten erhöht war.

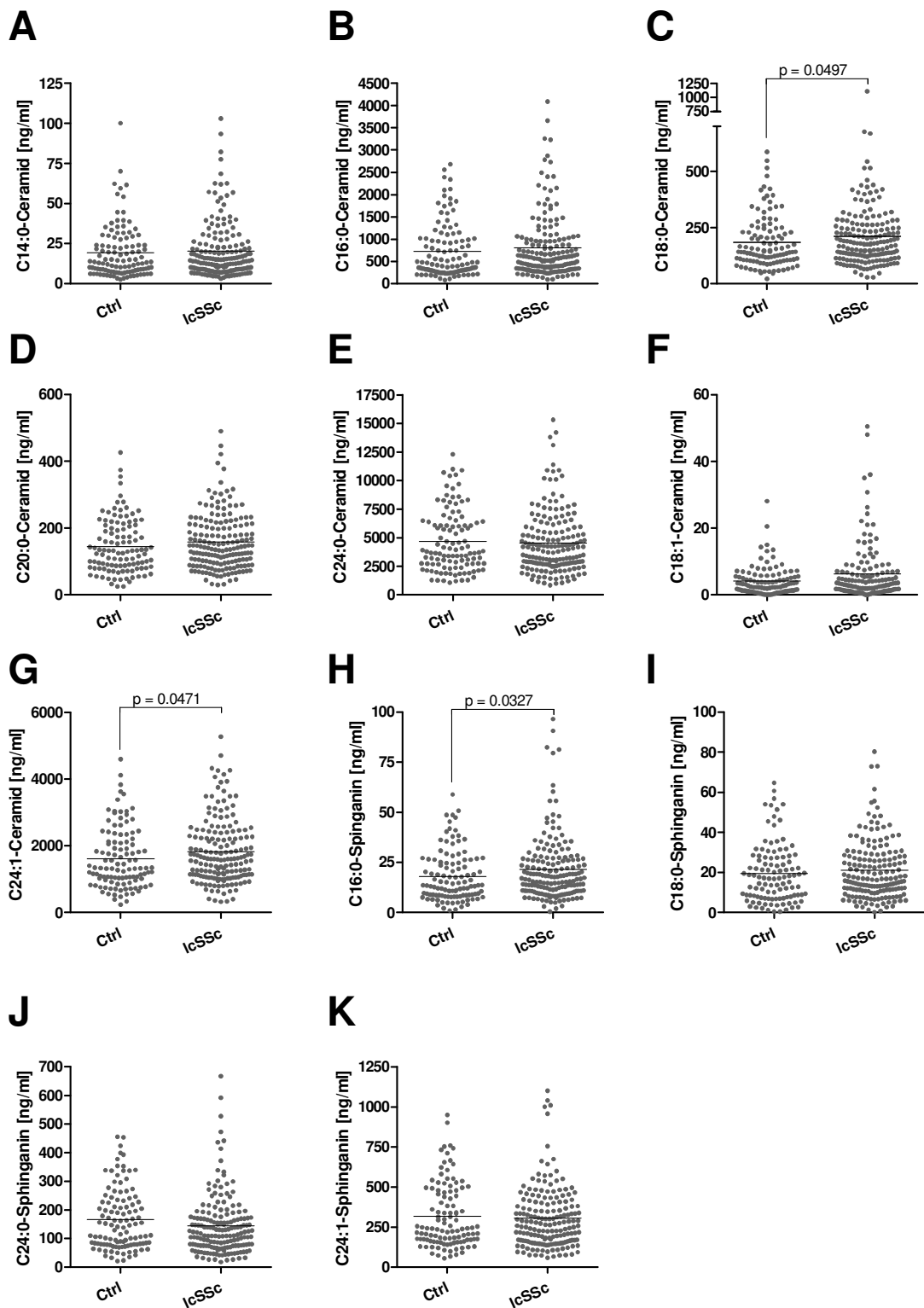


Abbildung 22: Ceramid-Plasmaspiegel der schwedischen lcSSc-Patienten. Alle Daten wurden per LC-MS/MS-Messung erhalten. (A) C14:0-, (B) C16:0-, (C) C18:0-, (D) C20:0-, (E) C24:0-, (F) C18:1- sowie (G) C24:1-Ceramid-Konzentrationen von 175 schwedischen lcSSc-Patienten und 112 gesunden schwedischen Probanden. (H) C16:0-, (I) C18:0-, (J) C24:0- und (K) C24:1-Dihydroceramid-Plasmaspiegel (Sphinganine) des schwedischen Kollektivs. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts. Die Datenanalyse wurde durchgeführt mit dem Mann-Whitney-U-Test. Ctrl: gesunde Probanden. lcSSc: lcSSc-Patienten.

Die Analyse der bereits bekannten Sphingolipide S1P, Sphingosin, Dihydroceramid und dhS1P im Plasma der lcSSc-Patienten, zeigte einen signifikant erhöhten S1P-Plasmaspiegel bei den Patienten (Gesunde Individuen: $378,8 \pm 98,00$ ng/ml vgl. lcSSc-Patienten: $428,2 \pm 117,9$ ng/ml, $p = 0,0006$; Abbildung 23C). Weder dhS1P oder Dihydroceramid noch Sphingosin unterschieden sich in ihren Plasmakonzentrationen bei gesunden Probanden und den Sklerodermie-Patienten (dhS1P: Kontrolle $65,70 \pm 25,09$ ng/ml vgl. lcSSc-Patienten $70,48 \pm 29,40$ ng/ml; Dihydroceramid: Kontrolle $5,577 \pm 5,018$ ng/ml vgl. lcSSc-Patienten $6,089 \pm 7,370$ ng/ml; Sphingosin: Kontrolle $41,33 \pm 46,54$ ng/ml vgl. lcSSc-Patienten $62,94 \pm 101,5$ ng/ml; Abbildung 23A, B, D).

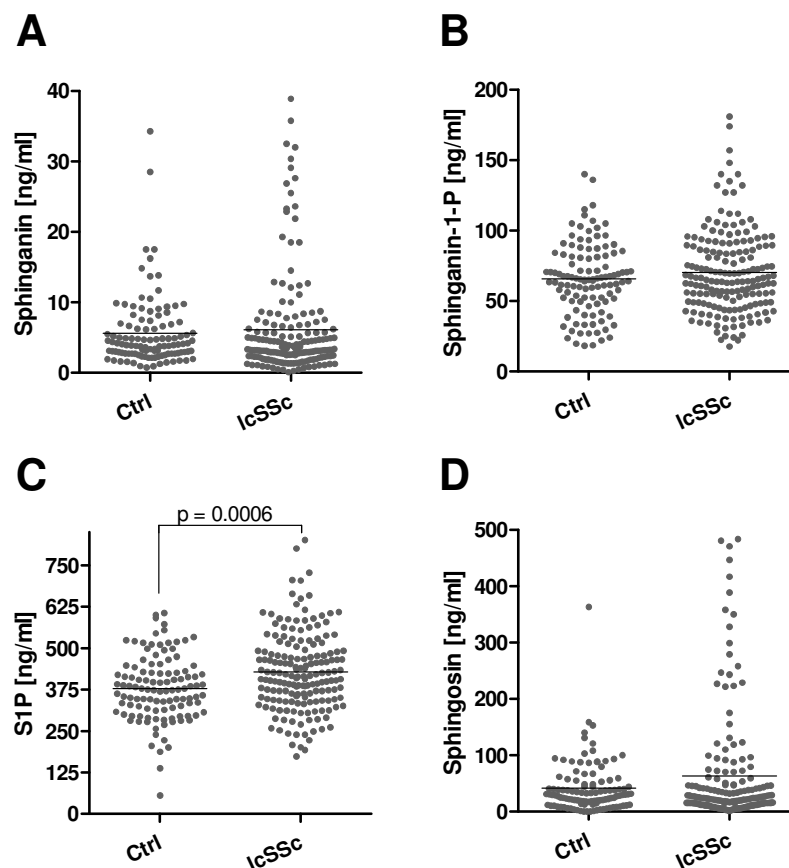


Abbildung 23: Sphingolipid-Plasmaspiegel der schwedischen lcSSc-Patienten. Alle Daten wurden per LC-MS/MS-Messung erhalten. (A) Dihydroceramid-, (B) Dihydroceramid-1-Phosphat-(Sphinganine-1-P)-, (C) S1P- sowie (D) Sphingosin-Konzentrationen von 175 schwedischen lcSSc-Patienten und 112 gesunden schwedischen Probanden. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts. Die Datenanalyse wurde durchgeführt mit dem Mann-Whitney-U-Test. Ctrl: gesunde Probanden. lcSSc: lcSSc-Patienten.

Insgesamt bestätigten die Plasma-S1P-Spiegel der schwedischen lcSSc-Patienten die Befunde aus Abschnitt 7.3.3 in dem bereits erhöhte S1P-Serumwerte in deutschen

lcSSc-Patienten gezeigt wurden. Außer S1P war keines der untersuchten Sphingolipide im Plasma der Sklerodermie-Patienten erhöht oder verringert.

Die beiden zuletzt im Plasma untersuchten Parameter waren das C16:0- und das C24:1-Glucosyl-Ceramid. Dabei wiesen die schwedischen lcSSc-Patienten einen signifikant erhöhten C24:1-Glucosyl-Ceramidspiegel auf (Kontrolle: $210,1 \pm 134,7$ ng/ml vgl. lcSSc-Patienten $228,1 \pm 306,6$ ng/ml, $p = 0,0140$; Abbildung 24B). Die C16:0-Glucosyl-Ceramidkonzentrationen waren im Plasma bei den gesunden Individuen ähnlich denen der lcSSc-Patienten ($42,52 \pm 32,32$ ng/ml vgl. lcSSc-Patienten $43,33 \pm 49,43$ ng/ml, $p = 0,2162$).

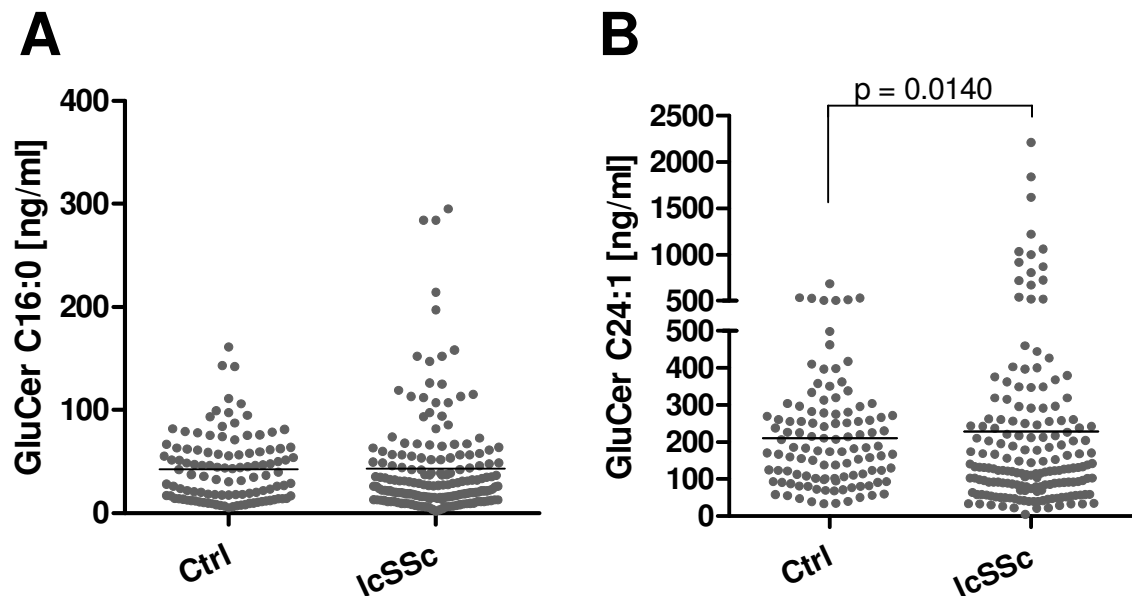


Abbildung 24: Glucosyl-Ceramid-Plasmaspiegel der schwedischen lcSSc-Patienten. Alle Daten wurden per LC-MS/MS-Messung erhalten. (A) C16:0-Glucosylceramid-, (B) C24:1-Glucosyl-Ceramid-Konzentrationen von 175 schwedischen lcSSc-Patienten und 112 gesunden schwedischen Probanden. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts. Die Datenanalyse wurde durchgeführt mit dem Mann-Whitney-U-Test. Ctrl, gesunde Probanden. lcSSc, lcSSc-Patienten.

Zusammengefasst zeigte diese abschließende LC-MS/MS-Analyse der schwedischen Plasmaproben, dass sich diese in ihrem Gehalt an C24:1-Glucosyl-Ceramid deutlich von den gesunden Kontrollindividuen unterscheiden, während die C16:0-Glucosyl-Ceramidspiegel im Vergleich zu den Kontrollen ähnlich waren.

7.3.5. Vergleich der Plasma- und Serum-Sphingolipidspiegel bezüglich intra-individueller Unterschiede

Da besonders das Sphingolipid S1P je nach Matrix (Serum oder Plasma) und methodischer Aufarbeitung eine unterschiedliche Stabilität ausweist (212), wurden die in den Abschnitten 7.3.2 und 7.3.4 gewonnen S1P-Konzentrationen der Serum- und Plasmaproben einzelner schwedischer lcSSc-Patienten gegenübergestellt (Abbildung 25). Dabei zeigte sich, dass das Verhältnis von Serum-S1P zu Plasma-S1P in den schwedischen Proben im Durchschnitt mit 3,83 um das 2,5-fache höher war als bei den deutschen Proben mit einem Quotienten von 1,13.

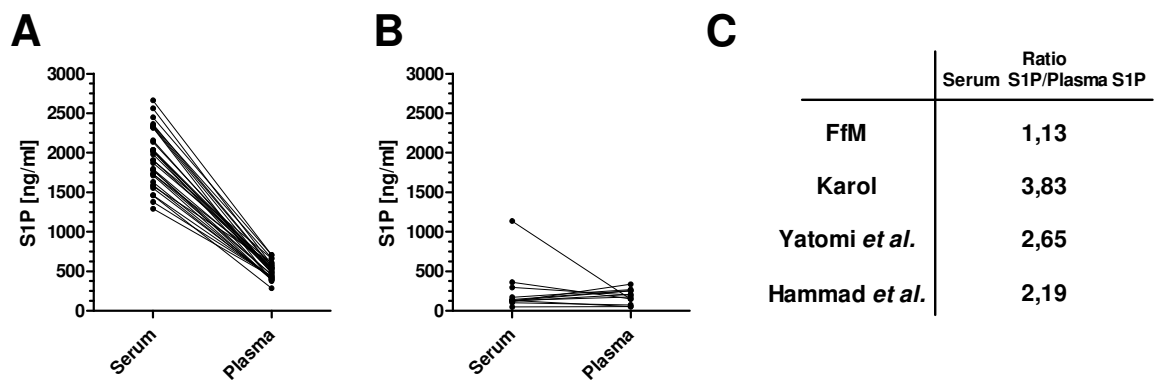


Abbildung 25: Vergleich des S1P-Gehalts im Serum und im Plasma der (A) schwedischen und (B) deutschen lcSSc-Proben. Die Proben wurden mittels LC-MS/MS auf ihren S1P-Spiegel überprüft (Schwedische Patienten: n = 32, Deutsche Patienten n = 9). (C) Darstellung des Serum-S1P/Plasma-S1P-Verhältnis der schwedischen Patienten (Karol) im Vergleich zu den deutschen Patienten (FfM) und bereits publizierten Ratio von Yatomi *et al.* und Hammad *et al.* (212, 213).

Die hier gemessenen Serum-S1P/Plasma-S1P-Verhältnisse lagen im Vergleich zu den publizierten Daten von Hammad *et al.* und Yatomi *et al.*, die eine Ratio von 2,19 bis 2,65 feststellen konnten, für die schwedischen Patienten deutlich oberhalb (Ratio 3,83) bzw. für deutsche Patienten unterhalb (Ratio 1,13) dieser Verhältnisse von Serum und Plasma-S1P-Konzentrationen. Da die Serum-S1P/Plasma-Verhältnisse der schwedischen und deutschen Kohorte sich deutlich voneinander unterschieden, wurden für einen besseren Vergleich der S1P-Messwerte beider Kollektive alle Serum-S1P-Resultate anhand des Serum-Plasma-Ratios in „Plasma-S1P-Äquivalente“ umgerechnet. Dazu wurden alle schwedischen S1P-Serumspiegel durch den Faktor 3,83 und alle deutschen S1P-Serumkonzentrationen durch den Faktor 1,13 dividiert. Die erhaltenen „Plasma-S1P-Äquivalente“ der deutschen

Probanden und Patienten wurden in einem weiteren Schritt an den deutlichen größeren schwedischen Unterschied zwischen Serum-S1P und Plasma-S1P angepasst. Die „Plasma-Äquivalente“ wurden hierfür mit dem Faktor 3,46 (S1P-Verhältnis von Serum zu Plasma der schwedischen Proben/ S1P-Verhältnis von Serum zu Plasma der deutschen Proben) multipliziert. Die normierten S1P-Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

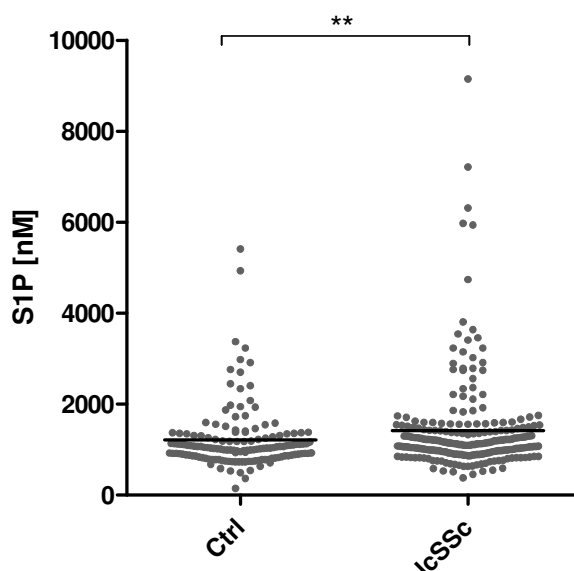


Abbildung 26: Normierte und angegliche S1P-Plasmaäquivalente der schwedischen und deutschen lcSSc-Patienten und Kontrollindividuen. Die Ergebnisse der LC-MS/MS-Messungen wurden wie folgt normiert: 1. Alle Serumwerte wurden in ihre S1P-Plasmaäquivalente umgerechnet. Die schwedischen Serumwerte (lcSSc-Patienten n = 38) wurden dividiert durch 3,81 (S1P-Verhältnis von Serum zu Plasma der schwedischen Proben) und die deutschen lcSSc- und Probandenserumergebnisse durch 1,13 (S1P-Verhältnis von Serum zu Plasma der deutschen Proben) dividiert wurden (lcSSc-Patienten n = 29, gesunde Probanden n = 19). 2. Die deutschen Plasmaäquivalente wurden bezüglich der schwedischen Plasmaäquivalente normiert. Sie wurden multipliziert mit 3,49 (S1P-Verhältnis von Serum zu Plasma der schwedischen Proben/ S1P-Verhältnis von Serum zu Plasma der deutschen Proben). Dargestellt sind die Plasma-S1P-Äquivalente von 146 gesunde Probanden und 242 lcSSc-Patienten mit dem jeweiligen Mittelwert. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. **p ≤ 0,01.

Die, beispielhaft für S1P durchgeführte, Normierung und Angleichung der S1P-Serum- und Plasmaresultate bestätigte den signifikanten Unterschied im S1P-Gehalt zwischen den lcSSc-Patienten und den Kontrollen, der bereits mit den S1P-Serumwerten des deutschen Kollektivs und den S1P-Plasmawerten der schwedischen Kohorte gezeigt wurde.

7.4. Serumspiegel bekannter Dermatofibrosemarker im Vergleich zu IL-33/ST2 und den Sphingolipiden

Die bisher untersuchten Sphingolipide und die Moleküle der IL-33/ST2-Achse wurden in einem weiteren Schritt mit neuen potentiellen Markern der Dermatofibrose, COMP und Lysyl-Oxidase (110, 113), verglichen. Innerhalb der letzten Jahre wurden diese Biomarker publiziert und zeigten einen Zusammenhang zwischen der voranschreitenden Fibrose der Haut, gemessen mittels mRSS, und dem jeweiligen Molekül.

Nachfolgend wurden COMP und Lysyl-Oxidase im Serum der lcSSc-Patienten analysiert und es wurde die Korrelation derselben mit der Hautbeteiligung überprüft. Abschließend wurden die COMP und Lysyl-Oxidase-Serumwerte auf ihren Zusammenhang mit S1P, dhS1P und sST2 untersucht.

7.4.1. COMP-Serumkonzentrationen unterscheiden sich nicht zwischen den SSc-Patienten und der Kontrollgruppen

COMP wurde kürzlich als möglicher serologischer Biomarker für die Dermatofibrose publiziert (112). Um die bisher gewonnen Resultate der Sphingolipid- und sST2-Messungen in Bezug zu der Fibrose der Haut zu setzen, wurden die COMP-Serumkonzentrationen mittels ELISA in der Frankfurter und der Karolinska-Kohorte analysiert.

Betrachtet man sowohl die Frankfurter als auch Karolinska Individuen, konnte ein leichter Anstieg des COMP-Serumspiegels in den LeRoy-Patienten als auch in den lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 1 bis 3 Jahren im Vergleich zu den 1.RP-Patienten gezeigt werden (Abbildung 27A). Dieser Anstieg verringerte sich in lcSSc-Patienten auf das Maß der gesunden Individuen (lcSSc 4-9 J.: $88,62 \pm 19,42$ ng/ml vgl. Ctrl.: $95,92 \pm 35,64$ ng/ml), wenn die SSc-Patienten eine Krankheitsdauer von mehr als vier Jahren überschritten. Der Unterschied in der COMP-Serumkonzentration zwischen den lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 1 bis 3 Jahren war signifikant höher als in Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 9 Jahren (lcSSc 1-3 J.: $106,4 \pm 6,886$ ng/ml vgl. lcSSc > 9 J.: $92,78 \pm 32,03$ ng/ml).

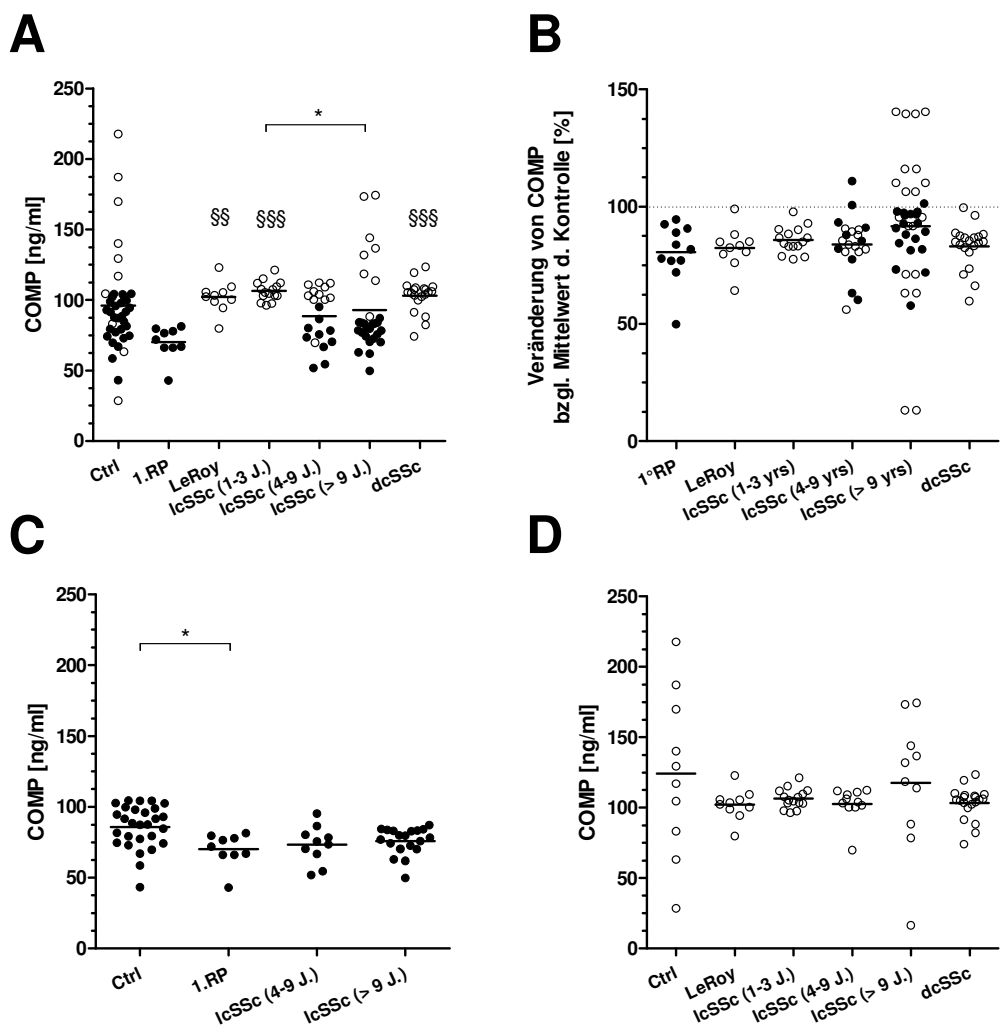


Abbildung 27: Resultate des COMP-ELISA der SSc-Patienten und der Kontrollgruppen. (A) COMP-Serumkonzentration der lcSSc- und dcSSc-Patienten und der entsprechenden Kontrollgruppen. Dargestellt sind Patienten aus dem Karolinska- und dem Frankfurter Kollektiv („early SSc“-Patienten: LeRoy, n = 10; lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 1 bis 3 Jahren: lcSSc (1-3 J.), n = 15; lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 4 bis 9 Jahren: lcSSc (4-9 J.), n = 18; lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 9 Jahren: lcSSc (> 9 J.), n = 19; Patienten mit diffuser SSc: dcSSc, n = 20) und die 1.Raynaud Phänomen-Patienten (1.RP; n = 12). (B) Auf die Mittelwerte der entsprechenden Kontrollgruppe (gesunde Individuen) normierte, prozentuale Veränderung des COMP-Serumspiegels der LeRoy-, SSc- und 1.RP-Patienten. Normierte COMP-Serumspiegel der (C) deutschen und der (D) schwedischen Patienten und Kontrollgruppen. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. Analyse der jeweilig angezeigten Gruppe gegeneinander: *p = 0,05. Die Paragraphen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den 1.RP Patienten an der jeweils markierten Gruppe (§§p ≤ 0,01, §§§p ≤ 0,001).

Da die gesunden Individuen beider Kontrollkohorten jedoch eine unterschiedliche Verteilung zeigten (FfM Ctrl. $85,88 \pm 15,13$ ng/ml vgl. Karolinska Ctrl. $124,0 \pm 57,83$ ng/ml; Abbildung 27A), wurden die Daten der jeweiligen Kohorte separat aufgetragen (Abbildung 27C, D). In diesen Einzelanalysen der COMP-Konzentrationen zeigte sich weder für die Frankfurter noch für die Karolinska Patienten ein deutlich erhöhter COMP-Spiegel. In Abbildung 27B ist sind die COMP-Serumkonzentrationen der

Individuen genormt auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollkohorte als prozentualer Anteil dargestellt. Hier zeigt sich zwischen den einzelnen Gruppen kein Unterschied in den COMP-Serumkonzentrationen. Die hier erhobenen COMP-Serumspiegel korrelierten nicht mit dem mRSS ($\rho = 0,254$, $p = 0,0147$).

Zusammenfassend stellt sich dar, dass der potentielle Biomarker COMP in den hier untersuchten Patienten kein eindeutiger Indikator für die SSc ist. Ausschließlich die frühen Erkrankungsstadien (LeRoy und lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 1 bis 3 Jahren) haben einen mäßig erhöhten COMP-Serumspiegel im Vergleich zu Patienten mit 1. Raynaud-Phänomen.

1.1.1. Der Lysyl-Oxidase-Serumspiegel korreliert bei der SSc nicht mit der Hautbeteiligung

Die Lysyl-Oxidase wird als potentieller Biomarker für die fibrotische Veränderung der Haut diskutiert (110). Sie korreliert mit dem mRSS bei SSc-Patienten. Um einen Vergleich des Biomarker-Potenzials zwischen S1P und der Lysyl-Oxidase zu ermöglichen, wurde von ausgewählten lcSSc-Patienten und den entsprechenden Kontrollindividuen der Lysyl-Oxidase-Serumspiegel mittels ELISA gemessen (Abbildung 28). Die Lysyl-Oxidase war bei LeRoy- und lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von bis zu 3 Jahren im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen leicht (LeRoy $1497 \pm 980,2$ pg/ml vgl. lcSSc 1-3 J. 1580 ± 1606 pg/ml vgl. Ctrl. $535,8 \pm 481,9$ pg/ml oder 1.RP $590,7 \pm 470,7$ pg/ml), jedoch nicht signifikant erhöht. Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 4 Jahren zeigten ähnliche Lysyl-Oxidase-Serumspiegel wie die Kontrollgruppen (lcSSc 4-9 J. $709,0 \pm 504,5$ pg/ml vgl. Ctrl. $535,8 \pm 481,9$ pg/ml oder 1.RP $590,7 \pm 470,7$ pg/ml). Wenn die Einteilung der lcSSc-Patienten bezüglich Krankheitsdauer aufgehoben wurde, war der Mittelwert der Lysyl-Oxidase-Konzentration geringer erhöht (lcSSc $897,7 \pm 1065$ pg/ml vgl. Ctrl. $535,8 \pm 481,9$ pg/ml oder 1.RP $590,7 \pm 470,7$ pg/ml; Abbildung 28). Die Lysyl-Oxidase-Serumkonzentrationen korrelierten, im Gegensatz zu Rimar *et al.* (110), nicht mit dem erhobenen mRSS ($\rho = -0,179$, $p = 0,327$).

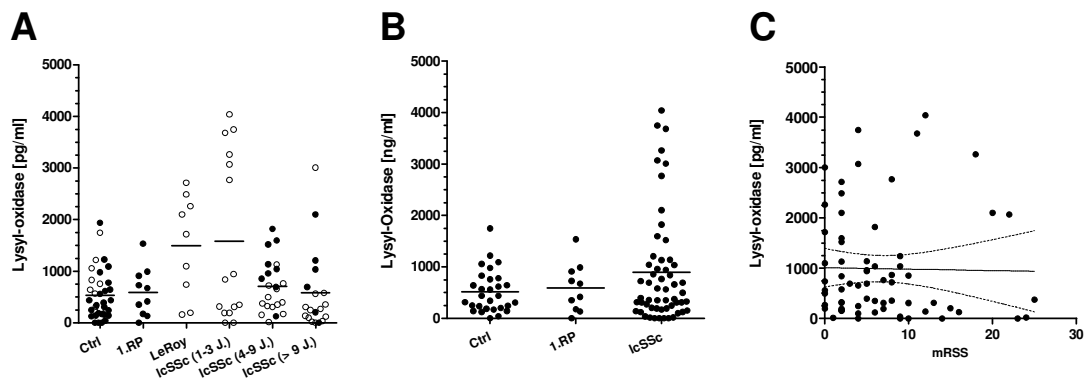


Abbildung 28: Lysyl-Oxidase-Serumspiegel ausgewählter lcSSc-, 1.Raynaud-Patienten (1.RP) und gesunder Probanden (Ctrl). Die Lysyl-Oxidase-Konzentrationen wurden per ELISA gemessen. (A) Analysiert wurden 35 gesunde Probanden, 10 1.RP- sowie 9 LeRoy-Patienten. Bei den lcSSc-Patienten wurden 15 Individuen mit einer Krankheitsdauer von 1-3 Jahren, 22 Patienten mit einer Erkrankungszeit von 4-9 Jahren und 19 Individuen mit einer Krankheitsdauer von > 9 Jahren untersucht. (B) Hier sind die gesunden Probanden (n = 35), die 1.RP-Patienten (n = 10) und alle lcSSc-Patienten (n = 38) dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Patienten. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt ist zusätzlich der Mittelwert. Analyse der Daten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. (C) Korrelationsanalyse der Lysyl-Oxidase-Serumkonzentrationen aller analysierter SSc-Patienten (n = 67), Spearmans Rho $\rho = -0,1341$, $p = 0,2795$.

Die hier untersuchte Lysyl-Oxidase war geringfügig, jedoch nicht signifikant, in den ersten drei Krankheitsjahren der lcSSc erhöht. Die erhaltenen Lysyl-Oxidase-Konzentrationen korreliert entgegen den Literaturangaben nicht mit der Hautbeteiligung (hier: mRSS).

7.4.3. Im frühen Stadium der SSc ist DKK-1 im Serum im Vergleich zu späteren Krankheitsstadien deutlich erhöht

Das Dickkopf-1-ähnliche Protein DKK-1 ist ein Inhibitor des Wnt-Signalwegs. Ein aktiver Wnt-Signalweg kann zu einer erhöhten ENDMT und verstärkten Expression von ECM-Molekülen führen (200). Für DKK-1 konnte bereits gezeigt werden, dass es in Hautbiopsien von SSc-Patienten in verringerten Konzentrationen vorliegt (201). Daher wurde die DKK-1-Serumkonzentrationen der SSc-Patienten und der Kontrollindividuen erhoben.

Die DKK-1-Serumspiegel sind in lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 1 bis 3 Jahren im Vergleich zu gesunden Kontrollindividuen signifikant erhöht ($2130 \pm 852,5$ pg/ml vgl. $991,4 \pm 915,2$ pg/ml; Abbildung 29A). Weiterhin zeigte sich nach diesem DKK-1-Anstieg zu Beginn der SSc eine deutliche Abnahme der DKK-1-Spiegel im weiteren Krankheitsverlauf. Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 9 Jahren weisen DKK-1-Serumkonzentrationen ähnlich denen der Kontrollgruppen auf ($738 \pm 769,8$ pg/ml vgl. $991,4 \pm 915,2$ pg/ml). Patienten mit einer etwas kürzeren Krankheitsdauer (4 bis 9 Jahre) unterscheiden sich signifikant von diesen lcSSc-Patienten

mit einem „Kontroll-ähnlichen“ DKK-1-Spiegel ($1610 \pm 921,8$ pg/ml vgl. $738 \pm 769,8$ pg/ml). Ebenso festzustellen war, dass dcSSc-Patienten eine ähnlich erhöhte DKK-1-Serumkonzentration wie die lcSSc-Patienten mit einer Erkrankungsdauer von 1 bis 3 Jahren aufwiesen ($1905 \pm 977,5$ pg/ml vgl. $2130 \pm 852,5$ pg/ml).

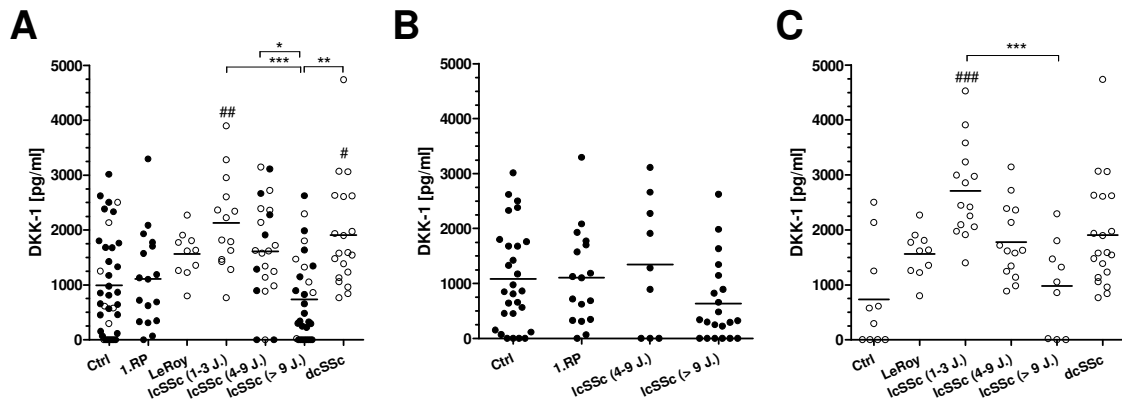


Abbildung 29: Per ELISA detektierte Serumlevel des Dickkopf-1-ähnlichem Proteins (DKK-1) der SSc-Patienten und der Kontrollgruppen. (A) Es wurden 38 gesunde Probanden, 17 Patienten mit 1.Raynaud-Phänomen (1.RP), 10 LeRoy- und 20 dcSSc-Patienten untersucht. Von den lcSSc-Patienten wurden 14 mit einer Krankheitsdauer von 1-3 Jahren, 23 mit einer Krankheitsdauer von 4-9 Jahren und 30 mit einer Krankheitsdauer von > 9 Jahren analysiert. In (B) sind die ausschließlich die Resultate der deutschen Individuen und in (C) die schwedischen Patienten und Probanden dargestellt. Alle Werte wurden als Duplikate erhoben. Abgebildet ist zusätzlich der Mittelwert. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. Analyse der jeweilig angezeigten Gruppe gegeneinander: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Die Rauten zeigen den signifikanten Unterschied zwischen der jeweiligen Gruppe und den gesunden Probanden an (# $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$).

Eine Einzelaufstellung der DKK-1-Resultate für jede der beiden Kohorten, verdeutlicht diesen Anstieg an DKK-1 in frühen lcSSc-Stadien (Abbildung 29B, C). Während dieser ansteigenden und schlussendlich abfallende Verlauf von DKK-1 gut in den Karolinska-Individuen ersichtlich ist, zeigten die Frankfurter SSc-Patienten einen geringeren Anstieg in der Gruppe der lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 4 bis 9 Jahren.

Zusammenfassend weist DKK-1 einen Konzentrationsanstieg im Serum bei den frühen lcSSc-Patienten mit einem rückläufigen Trend ab dem vierten Erkrankungsjahr auf. Für dcSSc-Patienten ist DKK-1 ebenfalls signifikant, ähnlich den lcSSc-Patienten mit der kürzesten Erkrankungsdauer, erhöht.

7.4.4. Korrelationsanalyse der Biomarker COMP, Lysyl-Oxidase sowie DKK-1 und den Sphingolipiden S1P und dhS1P

Nach der Erfassung der Sphingolipide, sST2 und den bereits bekannten serologischen Biomarkern für die Dermatofibrose, erfolgte eine Korrelationsanalyse dieser Parameter. Dabei wurde untersucht, ob die in dieser Arbeit als in der lcSSc erhöht nachgewiesenen Marker (S1P, dhS1P und sST2) mit den bekannten Biomarkern für die Dermatofibrose (COMP, Lysyl-Oxidase) oder dem Wnt-Inhibitor DKK-1 korrelieren (Tabelle 14). Es wurden sowohl alle lcSSc- als auch die dcSSc-Patienten in die Analyse eingeschlossen.

Obwohl in Abschnitt 7.4.1 nicht gezeigt werden konnte, dass COMP in den hier untersuchten SSc-Patienten erhöht war, korreliert es deutlich positiv mit S1P ($\rho = 0,52552$, $p \leq 0,001$) als auch etwas schwächer mit dhS1P ($\rho = 0,38445$, $p \leq 0,001$; Tabelle 14). Einen weiteren Zusammenhang konnte zwischen S1P und DKK-1 nachgewiesen werden (S1P und DKK-1: $\rho = 0,49547$, $p \leq 0,001$). Die Lysyl-Oxidase korrelierte nicht mit den S1P- oder den dhS1P-Konzentrationen bei SSc-Patienten. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen den dhS1P-Serumspiegeln und der DKK-1-Konzentration nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Korrelationsanalyse bekannter Biomarker (COMP, Lysyl-Oxidase) für die Dermatofibrose bei der SSc und S1P und dhS1P (Analyse mittels Spearmans Korrelationskoeffizient).

	S1P			dhS1P		
	ρ	p-Wert	n	ρ	p-Wert	n
COMP	0,52552	$\leq 0,001$	95	0,38445	$\leq 0,001$	95
LOX	0,34055	0,05246	33	0,33511	0,05659	33
DKK-1	0,49547	$\leq 0,001$	97	0,23340	0,02356	97

COMP, oligomeres Knorpelmatrixprotein; LOX, Lysyl-Oxidase, DKK-1, Dickkopf-ähnliches Protein1; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; dhS1P, dihydro-Sphingosin-1-Phosphat

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Serumspiegel von S1P mit COMP sowie DKK-1 von lcSSc-Patienten korreliert, während dhS1P ausschließlich mit den COMP-Serumkonzentrationen in Zusammenhang steht.

Eine detaillierte Untersuchung der SSc-Patienten hinsichtlich der Erkrankungsdauer und S1P, sST2, DKK-1 und den Dermatofibrose-Markern Lysyl-Oxidase und COMP, zeigte, dass

alle Marker unterschiedlich stark mit der Erkrankungsdauer korrelieren. Am stärksten war der Zusammenhang zwischen S1P und der Krankheitsdauer ($\rho = -0,572$, $p \geq 0,001$) (Tabelle 15). Ebenfalls, in absteigender Reihenfolge, korrelierten die Lysyl-Oxidase, DKK-1 und COMP negativ mit der Erkrankungsdauer (Lysyl-Oxidase: $\rho = -0,410$, $p \geq 0,001$; DKK-1: $\rho = -0,350$, $p \geq 0,001$; COMP: $\rho = -0,258$, $p \geq 0,05$). Alleine sST2 wies eine positive Korrelation mit der Krankheitsdauer auf ($\rho = 0,330$, $p \geq 0,01$).

Tabelle 15: Korrelationsanalyse zwischen der Erkrankungsdauer und den Serumspiegel diverser Marker in SSc-Patienten (Analyse mittel Spearmans Korrelationskoeffizient).

	Spearmans Rho (ρ)	P-Wert	n
S1P	- 0,572	$\geq 0,001$	95
DKK-1	- 0,350	$\geq 0,001$	97
Lysyl-Oxidase	- 0,410	$\geq 0,05$	33
COMP	- 0,258	$\geq 0,05$	95
sST2	0,330	$\geq 0,01$	97

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle analysierten Parameter mit der Progression der Sklerodermie verknüpft sind. S1P, die Lysyl-Oxidase, COMP und DKK-1 korrelierten negativ mit der Erkrankungsdauer, während sST2 als einziger Biomarker im Verlauf der Erkrankung ansteigt und positiv mit derselben korreliert.

7.4.5. Korrelationsanalyse der Biomarker COMP, Lysyl-Oxidase sowie DKK-1 und sST2

Ähnlich den Sphingolipiden wurden die IL-33- und die sST2-Serumspiegel mit dem mRSS und den Dermatofibrosemarkern COMP und Lysyl-Oxidase korreliert. IL-33 stand in keinem Zusammenhang zu einem der aufgeführten Parameter (Tabelle 16). Der sST2-Serumspiegel korrelierte ausschließlich in negativ mit S1P ($\rho = -0,33165$; $p \geq 0,001$).

Tabelle 16: Korrelationsanalyse bekannter Biomarker (COMP, Lysyl-Oxidase) für die Dermatofibrose bei der SSc und sST2 (Analyse mittels Spearmans Korrelationskoeffizient, Spearmans Rho).

	sST2		n	IL-33		n
	ρ	p-Wert		ρ	p-Wert	
mRSS	0,6593	0,52780	95	-0,10334	0,32422	95
COMP	- 0,16800	0,10363	95	0,11175	0,28091	95
LOX	- 0,08735	0,62882	33	0,18484	0,30309	33
DKK-1	- 0,16423	0,10793	97	0,24969	0,01364	97
S1P	- 0,33165	$\geq 0,001$	95	0,12991	0,21201	95

mRSS, modifizierter Rodnan Haut-Score; COMP, oligomeres Knorpelmatrixprotein; LOX, Lysyl-Oxidase, DKK-1, Dickkopf-ähnliches Protein1; S1P, Sphingosin-1-Phosphat

Diese Ergebnisse zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen den sST2- und IL-33-Serumspiegel sowie der Hautbeteiligung besteht. Für die weitere Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen ist die mäßige, aber signifikante Korrelation zwischen S1P und sST2 im Serum von SSc-Patienten.

7.5. Evaluation zusätzlicher Zytokine und Chemokine als serologische Biomarker für die SSc mittels Proteinarray

Für die weitere Suche nach serologischen Biomarkern zur Frühdiagnose der SSc, wurde, beruhend auf der Hypothese des Endothelzellschadens und einer möglichen Aktivierung und Migration von Immunzellen zum geschädigten Areal, 102 Zytokine und Chemokine im Serum von vier ausgewählten lcSSc-Patienten und alters- und geschlechtsentsprechenden gesunden Probanden analysiert. Dies sollte eine breit aufgestellte Suche bezüglich anderer Signalmoleküle, die möglicherweise von geschädigten Endothelzellen oder einwandernder Immunzellen sezerniert werden, gewährleisten.

7.5.1. PDGF-AB/BB, IL-4, EMMPRIN, IL-1ra sowie ENA-78 sind im Serum von lcSSc-Patienten erhöht

Zur Evaluierung weiterer potentieller Biomarker für die lcSSc wurden Serumproben von vier lcSSc-Patienten und vier entsprechenden Kontrollen auf 102 Zytokine und Chemokine auf Proteinebene mittels des Cytokine XL Array Kit geprüft. Jeder Messwert wurde im Duplikat durchgeführt und in den nachfolgenden Abbildungen als Mittelwert beider Messwerte dargestellt. Um einen Vergleich der Probanden- und Patienten-Resultate zu ermöglichen, beziehen sich die Ergebnisse auf die Referenz-Probe 1 des jeweiligen Assay.

Ein entwickelter Chemilumineszenz-Film, auf dem beispielhaft die Ergebnisse eines der untersuchten lcSSc-Patienten und des entsprechenden Kontrollindividuum abgebildet sind, findet sich in Abbildung 30. Markiert sind in dieser Abbildung die mit dem bloßen Auge erkennbaren Unterschiede in der Signalintensität der geprüften Zytokine oder Chemokine (u. a. ST2, MIF, DKK-1).

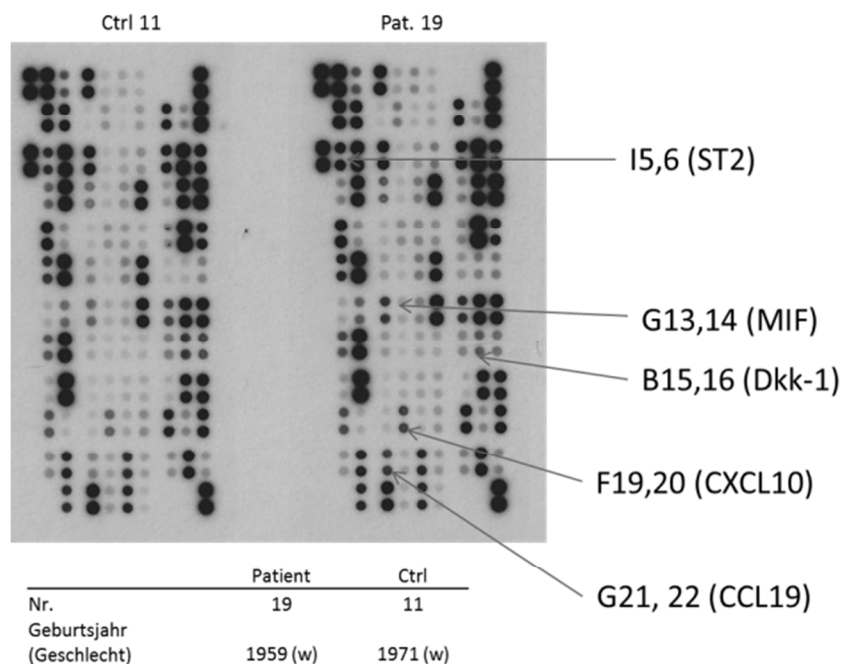


Abbildung 30: Darstellung eines Films mit zwei entwickelten Arrays für (links) einen gesunden Proband (Nr. 11) und (rechts) einen lcSSc-Patienten (Nr. 19) aus der Frankfurter Kohorte. Nomenklatur: Buchstaben stehen für die Spalte (A = Spalte 1), Zahlen für die Zeile des Arrays (13 = Zeile 13); in Klammern finden sich die dort nachzuweisenden Substanzen, z. B. ST2.

Die Auswertung erfolgte mit der „Quantity One“-Software. Jeder Parameter wurde im Duplikat analysiert und aus beiden Intensität der jeweilige Mittelwert berechnet. Jedes Individuum wurde mittels einer mit Antikörpern-beschichteten Membran, auf der sich

jeweils die Referenz 1 befand, untersucht. Diese erhobenen Mittelwerte der analysierten Zytokine und Chemokine wurden auf den Mittelwert der Referenz 1 normiert. Diese normierten Mittelwerte sind in Abbildung 31 dargestellt.

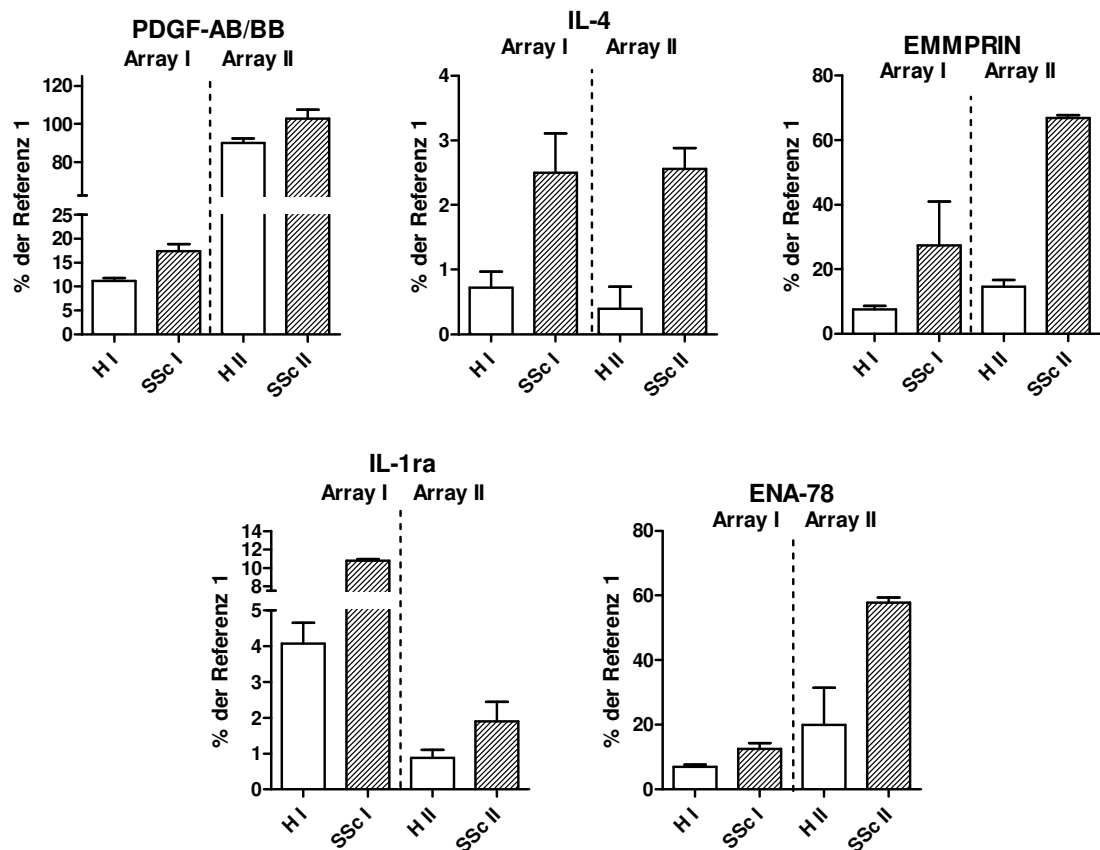


Abbildung 31: Densitometrische Auswertung des Cytokine-XL Arrays von vier lcSSc-Patienten und vier gesunden Probanden. In zwei zeitlich voneinander getrennt durchgeführten Arrays wurden jeweils 2 Patienten und Probanden auf die Serumkonzentrationen unterschiedlicher Zytokine und Chemokine untersucht. Hier dargestellt sind die Parameter, welche sich deutlich in ihrer Serumkonzentration zwischen den lcSSc-Patienten und den gesunden Probanden unterscheiden. Diese Analyten waren PDGF-AB/BB (von Blutplättchen produzierte Wachstumsfaktoren AB, BB), IL-4 (Interleukin-4), EMMPRIN (extrazellulärer Induktor der Matrixmetalloproteinasen), IL-1ra (Interleukin-1-Rezeptorantagonist) sowie ENA-78 (Chemokine CXCL5). H entspricht den gesunden (engl. *healthy*) Individuen, SSc den lcSSc-Patienten. Die Nummerierung I bzw. II bezieht sich auf die Arraynummer (Array I oder Array II). Es sind pro Array jeweils zwei gesunde Probanden bzw. zwei lcSSc-Patienten als ein Balken des Diagramms dargestellt (H I \equiv zwei gesunde Probanden untersucht in Array I).

Die densitometrische Auswertung zeigte, dass vier verschiedene Molekülklassen bei den lcSSc-Patienten in erhöhten Konzentrationen im Serum vorliegen. Dazu zählte der Wachstumsfaktor PDGF-AB/BB, der extrazelluläre Induktor der Matrixmetalloproteinase EMMPRIN, das Chemokin ENA-78 und die zu der Interleukinfamilie gehörenden

Interleukin-4 und der Rezeptorantagonist des IL-1 (IL-1ra). Am deutlichsten zeigte sich der Unterschied in der Signalintensität zwischen den gesunden Probanden und den Patienten bei IL-4 (3,5- bis 6-fach erhöht) und EMMPRIN (3,6- bis 4,7-fach erhöht).

Insgesamt wiesen 96 der analysierten 102 Parameter keine eindeutigen Unterschiede in der Signalintensität zwischen den Kontroll- und den erkrankten Individuen auf. Von den 6 veränderten Analyten wurde sST2 bereits in Abschnitt 7.2.2 beschrieben. Die hier dargestellten und in lcSSc-erhöhten Zytokine und Chemokine umfassen PDGF-AB/BB, IL-4, EMMPRIN, IL-1ra und ENA-78.

7.6. Modulation der Parameter S1P, dhS1P und ST2 durch Therapie mit Iloprost

Deutsche lcSSc-Patienten mit akuten 2.Raynaud-Phänomen erhielten in der Rheumatologie eine Therapie mit Iloprost. Dies ist ein starker Vasodilatator und wird zur Schmerzmilderung und Verbesserung der Durchblutung der äußeren Extremitäten eingesetzt. Dabei erhielten die Patienten an jeweils fünf Tagen eine *i.v.* Iloprost-Infusion. Die vor der ersten und nach der letzten Iloprost-Infusion abgenommenen Serumproben, wurden nachfolgenden auf potentielle Veränderungen bezüglich der Serumspiegel der Sphingolipide und IL-33 sowie sST2 untersucht.

7.6.1. Positive Effekte einer *i.v.* Iloprost-Behandlung auf die S1P- und dhS1P-Serumspiegel bei lcSSc-Patienten mit sekundärem Raynaud-Phänomen

Sieben lcSSc-Patienten erhielten die Iloprost-Therapie. Es wurden die Sphingolipide S1P, dhS1P und Sphingosin per LC-MS/MS gemessen.

In Serumproben dieser Patienten stiegen sowohl S1P als auch dhS1P an (S1P: Tag 1 100 % vgl. Tag 5 $131,8 \pm 28,39$ %, $p = 0,0313$; dhS1P: Tag 1 100 % vgl. Tag 5 $132,5 \pm 24,12$ %; $p = 0,0313$; Abbildung 32). Die Sphingosin-Serumspiegel waren weder signifikant erhöht, noch verringert (Tag 1 100 % vgl. Tag 5 $104,0 \pm 94,44$ %, $p = 1,00$).

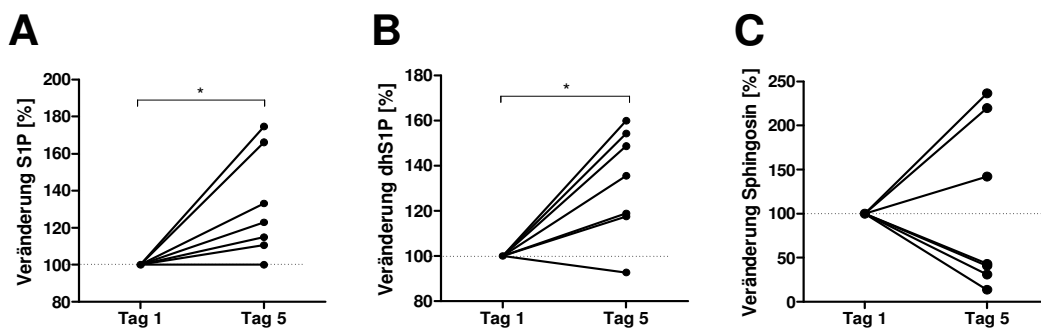


Abbildung 32: Prozentuale Veränderungen nach der fünftägigen Iloprost-Behandlung bei lcSSc mit sekundärem Raynaud Phänomen der (A) S1P-, (B) dhS1P- und (C) Sphingosin-Serumkonzentration. Serumproben wurden an Tag 1 vor der ersten Iloprost-Infusion und an Tag 5 nach der letzten Infusion von 7 lcSSc-Patienten entnommen und per LC-MS/MS untersucht. Die Datenpunkte ein- und desselben Patienten sind per Linie miteinander verbunden. Die unterbrochene Linie zeigt den normierten Ausgangswert des jeweiligen Parameters an. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-*matched-pairs-signed-rank*-Test. * $p \leq 0,05$.

Insgesamt zeigte die Behandlung mit Iloprost einen Einfluss auf den Serumgehalt der Sphingolipide S1P und dhS1P bei lcSSc-Patienten. Der Sphingosin-Serumspiegel veränderte sich nach der Iloprost-Medikation je nach Patienten positiv oder negativ, zeigte dabei keinen eindeutigen Trend.

7.6.2. Negative Effekte einer *i.v.* Iloprost-Behandlung auf die sST2-Serumspiegel bei lcSSc-Patienten mit sekundärem Raynaud-Phänomen

Bei den in Abschnitt 7.6.1 erwähnten lcSSc-Patienten wurden ebenfalls die IL-33- und die sST2-Serumkonzentrationen per ELISA bestimmt. Bei IL-33 konnte keine signifikante Veränderung des Serumspiegels bei Patienten nach der Iloprost-Behandlung festgestellt werden (Tag 1: 100 % vgl. Tag 5: 2091 ± 2908 %, $p = 0,3964$; Abbildung 33A). Die sST2-Konzentrationen nahmen in 6 von 7 Fällen ab (Tag 1: 100 % vgl. Tag 5: $96,45 \pm 77,25$ %, $p = 0,4375$, Abbildung 33B).

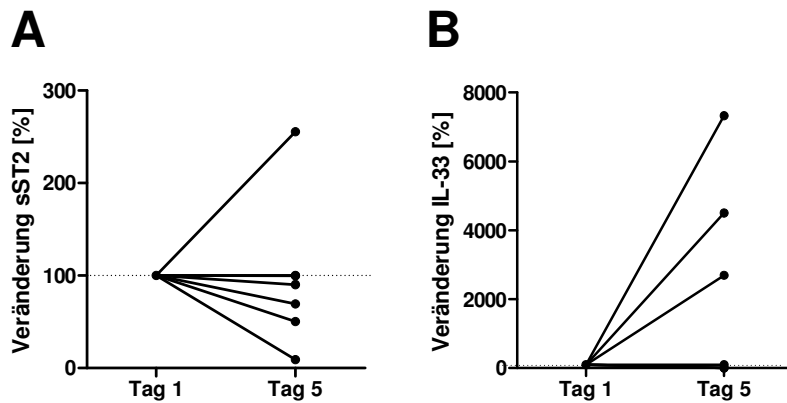


Abbildung 33: Prozentuale Veränderungen nach der fünftägigen Iloprost-Behandlung bei lcSSc mit sekundärem Raynaud Phänomen (n = 7) der (A) sST2- sowie (B) IL-33-Serumkonzentration. Serumproben wurden an Tag 1 vor der ersten Iloprost-Infusion und an Tag 5 nach der letzten Infusion von 7 lcSSc-Patienten entnommen und per ELISA untersucht. Die Datenpunkte ein- und desselben Patienten sind per Linie miteinander verbunden. Die unterbrochene Linie zeigt den normierten Ausgangswert des jeweiligen Parameters an. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-*matched-pairs-signed-rank*-Test.

Zusammenfassend ließ sich kein genereller Effekt der Iloprost-Behandlung auf die IL-33- sowie die sST2-Serumkonzentrationen in lcSSc-Patienten feststellen. Bei den sST2-Resultaten fiel jedoch auf, dass 6 von 7 lcSSc-Patienten eine Verringerung des sST2-Spiegels nach den Iloprost-Infusionen aufwiesen.

7.6.3. Gegenläufige Effekte einer *i.v.* Iloprost-Behandlung auf die COMP- und DKK-1-Serumspiegel bei lcSSc-Patienten mit sekundärem Raynaud-Phänomen

Parallel zu dem Sphingolipid-Profil wurden die, in den Abschnitten 7.4.1 und 7.4.3 behandelten, möglichen Biomarkern COMP und DKK-1 im Serum der lcSSc-Patienten analysiert. Keiner der beiden Marker war nach der Iloprost-Behandlung deutlich erhöht oder verringert (COMP: Tag 1 100 % vgl. Tag 5 $98,69 \pm 36,27$ %, $p = 0,375$; DKK-1: Tag 1 100 % vgl. Tag 5 $138,3 \pm 177,0$ %, $p = 0,4922$; Abbildung 34).

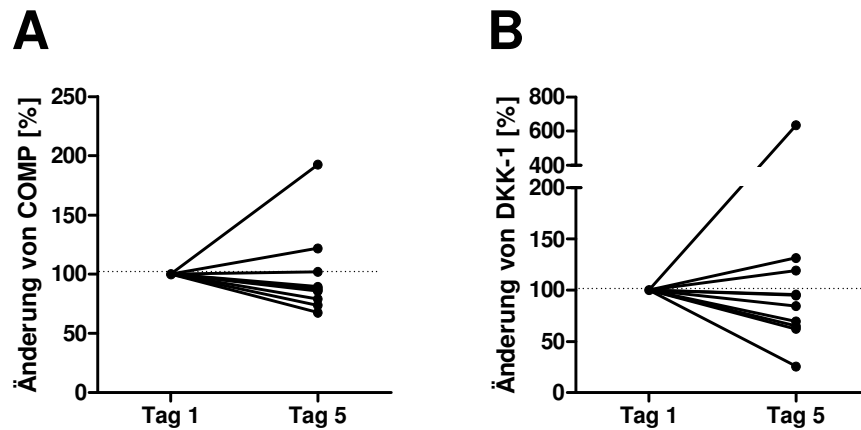


Abbildung 34: Prozentuale Veränderungen nach der fünftägigen Iloprost-Behandlung bei lcSSc mit sekundärem Raynaud Phänomen (n = 7) der (A) COMP- sowie (B) DKK-1-Serumkonzentration. Serumproben wurden an Tag 1 vor der ersten Iloprost-Infusion und an Tag 5 nach der letzten Infusion von 7 lcSSc-Patienten entnommen und per ELISA untersucht. Die Datenpunkte ein- und desselben Patienten sind per Linie miteinander verbunden. Die unterbrochene Linie zeigt den normierten Ausgangswert des jeweiligen Parameters an. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-*matched-pairs-signed-rank*-Test.

Abschließend lässt sich festhalten, dass eine Therapie mit Iloprost bei lcSSc-Patienten keinen signifikanten Einfluss auf die Serumkonzentrationen von COMP, einen Biomarker der Hautbeteiligung, sowie DKK-1 hat.

8. Diskussion

Bei der systemischen Sklerose handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung des Bindegewebes. Charakteristisch sind vor allem eine progressive Vaskulopathie sowie eine generalisierte Fibrose des Bindegewebes speziell der Haut, des Herzen und der Lunge. Die Sklerodermie geht einher mit mannigfaltigen klinischen Symptomen und einer erhöhten Mortalität (214). Sie wird in sechs Subtypen unterteilt. Am häufigsten treten die auf die Haut limitierte (lcSSc) (54 bis 72 % aller SSc-Patienten) und die diffuse Sklerodermie (dcSSc) (23 bis 35 %) auf (10, 75, 76). Das Overlap-Syndrom kommt in weniger als 10 % der Sklerodermie-Patienten vor, während etwa 8 % der Patienten eine undifferenzierte und weniger als 1 % eine Sklerodermie sine Skleroderma (72) aufweisen. Selten treten auch Morphea ohne systemische Beteiligung auf. Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit den lcSSc- und dcSSc-Patienten, da diese mehr als die Hälfte aller SSc-Patienten darstellen.

Die klinische Präsentation der lcSSc und dcSSc ist sehr heterogen und gestaltet daher die Diagnose der Erkrankung schwierig. Sie beruht derzeit auf klinisch-präsenten Symptomen und einem Nachweis spezifischer Auto-Antikörper. Die Auto-Antikörper treten in vielen Patienten erst in späteren Stadien der Sklerodermie auf und lassen oftmals keine eindeutige Zuordnung zu einem der beiden Subtypen zu (215). Dies macht eine frühzeitige und präzise Diagnose zusätzlich schwierig. Insbesondere im Anfangsstadium der SSc, wo eine eindeutige klinische Symptomatik oftmals fehlt, bleibt die Diagnostizierung der SSc aus. Aufgrund dieser diagnostischen Problematik und der verständlichen Zurückhaltung der Fachärzte bei der Verordnung von, mit teilweise starken Nebenwirkungen einhergehenden, Medikamenten, ist die Folge meist eine Verzögerung des Therapiebeginns. Nach wie vor werden bei der Behandlung der SSc nur wenige Medikamente zur Heilung eingesetzt. Die therapeutische Intervention erfolgt ausgenommen symptom-orientiert. Deshalb besteht ein hoher Bedarf an neuen Biomarkern zur Früherkennung der SSc, um eine möglichst zeitige Therapie zu gewährleisten. Bisher sind weder die Pathophysiologie der Sklerodermie umfassend geklärt, noch gibt es validen, diagnostischen Biomarker für die lcSSc oder die dcSSc. Daher ist die Grundlage dieser Arbeit ein endothelzell-zentriertes, pathophysiologisches Konzept der Sklerodermie. Im Rahmen dieses Konzepts wurden mögliche diagnostische Biomarker evaluiert. Bei dieser pathophysiologischen Hypothese wird, wie zuvor in einigen Veröffentlichungen diskutiert (216, 217), ein Endothelzellschaden als pathophysiologischer Ausgangspunkt der Sklerodermie angenommen.

Manetti *et al.* zeigten im Sinne dieser Hypothese, dass es zu einer Verschlechterung der Angiogenese bei SSc-Patienten kommt, die auf einer veränderten Expression von VEGF-A beruht (218). In Hautbiopsien sowie im Serum von SSc-Patienten fand sich verstärkt die anti-angiogenetische Isoform des VEGF-B. Dies könnte eine Ursache für die gestörte adaptive Angiogenese bei SSc-Patienten sein. Jimenez diskutierte die Rolle der Endothelial-Mesenchymalen Transition von Endothelzellen als eine Konsequenz der gestörten Endothelzellbarriere (29). Für eine gestörte bzw. geschädigte Endothelzellschicht sprechen die erhöhten Konzentrationen an Adhäsionsmolekülen und angiogenetischen Zytokine im Blut von SSc-Patienten (219–223). Ein weiterer Aspekt der Endothelzell-zentrierten Hypothese ist der damit einhergehende oxidative Stress durch reaktive oxygene Spezies (ROS). Erste Evidenzen belegen, dass durch NADPH-Oxidasen (u. a. NOX4) produzierte ROS die Seneszenz begünstigen und dadurch den fibrotischen Umbau der Endothelzellen und Fibroblasten in der SSc initiieren und etablieren (224). Diese beispielhaft aufgeführten Publikationen, sowie viele weitere Befunde für eine endothelzell-zentrierte Pathogenese sprechen. Deshalb wurden in dieser Arbeit die IL-33/ST2-Achse und die Sphingolipide auf Grund ihrer Nähe und Relevanz bezüglich des Endothels und seiner Funktion ausgesucht und auf ihre Eignung als Biomarker untersucht.

8.1. Analyse und Vergleich der untersuchten Patientenkollektive

Die hier untersuchten Sklerodermie-Patienten entsprechen in ihren epidemiologischen Charakteristika deutlich bereits beschriebenen SSc-Kollektiven. Mit einem Anteil von 73,9 % bis 90 % an betroffenen Frauen je Subgruppe, entspricht das Verhältnis von Frauen zu Männern dem, in neueren Studien beschriebenen, Verhältnis von 4,7:1 bzw. 82,3 % bis 88% (78, 225, 226). Das durchschnittliche Alter aller SSc-Patienten lag hier bei 59,02 Jahren mit einer Spanne von 27 bis 77 Jahren. Ähnliche Angaben finden sich für andere kaukasische SSc-Kollektive (50,6 bis 60 Jahre, Spanne 12 bis 93 Jahre) (78, 226, 227). Das Alter zum Beginn der Sklerodermie lag im Mittel bei 50,12 Jahren mit einer Spanne von 22 bis 75 Jahren. Die meisten SSc-Patienten erkrankten während des vierten Lebensjahrzehnts (78, 227, 228). Die hier untersuchten SSc-Patienten sind mit einem Alter von 50,12 Jahren zu Beginn der Erkrankung nur unwesentlich älter als die bereits beschriebenen Vergleichskollektive (Tabelle 6).

In dieser Studie wurden in lcSSc-Patienten neben den IL-33-Serumkonzentrationen zum ersten Mal die sST2-Serumspiegel untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass lösliches, zirkulierendes ST2 im Serum von lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als

neun Jahren signifikant erhöht ist. Dieser Anstieg ist spezifisch für das später Stadium der lcSSc verglichen mit den untersuchten Serumproben der dcSSc-Patienten und den Kontrollgruppen. In den analysierten Serum- und Plasmaproben wurde des Weiteren gezeigt, dass diverse Sphingolipidkonzentrationen in der lcSSc dereguliert waren. Zu den veränderten Sphingolipiden zählte S1P, die Ceramide C18:0, C24:1, das Dihydro-Ceramid C16:0 und das Glucosyl-Ceramide C24:1. S1P und sST2 korrelierten, gegenläufig, mit der Krankheitsdauer. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen den Dermatofibrosemarkern COMP und Lysyl-Oxidase und S1P sowie dhS1P gezeigt werden.

Die Resultate der klinisch-chemischen Analyse der Blutproben zeigten für vier der deutschen SSc-Patienten erhöhte CRP-Werte (CRP-Konzentration größer als 0,5 mg/dl) (Abbildung 12). Diese sind auf eine dokumentierte erosive Arthritis zurückzuführen. Akute Infektionen zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurden vor der Probenentnahme ausgeschlossen. Die Kreatininspiegel lagen bei sieben Patienten deutlich über den Referenzbereichen. Falsch-positive Kreatininspiegel können ermittelt werden, wenn Patienten Acetylsalicylsäure, Cyclosporin, Vitamin C oder Cephalosporine vor der Blutentnahme einnehmen. Bei Patienten 26 und 27 war dies der Fall. Die Untersuchung der Hämatologie zeigte weder eine erhöhte noch verringerte Erythrozyten- sowie Leukozytenanzahl im Serum der Patienten (Abbildung 13).

In den eigenen kapillarmikroskopischen Analysen zeigten sich pathognomische Veränderung der Kapillarstruktur in dem Nagelfalz (Abbildung 15). Für die im Karolinska-Institut untersuchten SSc-Patienten wurde nur der allgemeine Kapillarstatus (*early*, *active*, *late*) erhoben, während für die deutschen SSc, die 1.RP-Patienten sowie die gesunden Probanden mittels einer kapillarmikroskopischen Untersuchung ein detaillierter Befund der Veränderungen der Kapillararchitektur erstellt wurde (Abbildung 14). Alle SSc-Patienten wiesen eine Veränderung der Kapillararchitektur auf. Die deutschen SSc-Patienten wiesen eine signifikante Abnahme der Kapillardichte und Megakapillaren auf. Die kapillarmikroskopische Untersuchung des Nagelfalzes ist ein wichtiger Bestandteil der frühen SSc-Diagnose. Sie ermöglicht die Differenzierung zwischen einem 1.Raynaud-Phänomen, einer idiopathischen Störung der Mikrozirkulation der äußeren Extremitäten, und dem 2.Raynaud-Phänomen als Symptom einer Erkrankung (59). Während das 1.Raynaud-Phänomen eine Ersterkrankung ist, handelt es sich bei dem 2.Raynaud-Phänomen um eine Folgeerkrankung einer bereits vorliegenden Grunderkrankung. Bei dieser Grunderkrankung handelt es sich in vielen Fällen um eine Kollagenose wie z. B. die Sklerodermie. Über 87 % der SSc-Patienten weisen ein 2.RP auf (1, 2). Cutolo *et al.* unterteilen die vaskulären Veränderungen je nach Fortschritt in drei Stadien: *early*, *active*

und *late* (204). Das erste Stadium (*early*) zeichnet sich durch das erste Auftreten von vergrößerten Kapillaren und Mikrohämorrhagien aus. Diese Veränderungen verstärken sich im aktiven Stadium (*active*). Während die vergrößerten Kapillaren im späten Stadium (*late*) ebenfalls zu finden sind, verschwinden die Megakapillare und die Mikrohämorrhagien. Dafür nimmt die Kapillardicht rapide ab und eine Desorganisation der Kapillarstruktur zu (229). Kritisch ist anzumerken, dass Cutolo *et al.* offen ließen, inwieweit diese Stadien der Kapillarveränderungen in Zusammenhang mit dem Verlauf oder der Schwere der SSc stehen. Lediglich ein Zusammenhang zwischen der Erkrankungsdauer und dem späten Stadium wurde diskutiert. So ging eine längere Erkrankungsdauer der Patienten oftmals mit dem späten Stadium in der Kapillarstruktur einher. Dies bestätigt auch sich teilweise in den hier untersuchten SSc-Patienten. Die schwedischen Patienten mit einer Krankheitsdauer von vier bis neun Jahren wiesen in keinem Fall das frühe Kapillarmuster auf, während bei den Patienten mit einer Krankheitsdauer von weniger als 3 Jahren bei ungefähr zwei Drittel der Patienten das frühe oder das aktive Stadium vorlag. Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als neun Jahren zeigten verstärkt das späte Stadium der Kapillarveränderungen. Neuere Studien zeigen, dass angiogenetische Faktoren, z. B. Endothelinrezeptoren (ET-1), den verschiedenen Kapillarmustern zugeordnet werden können (216, 230, 231). Im frühen Stadium der Kapillarveränderung findet man Faktoren, die pro-angiogenetisch (VEGF, Kallikrein (222, 232)) sowie pro-inflammatorisch wirken oder die bei Aktivierung der Endothelzellen verstärkt exprimiert werden (sJAM-A, sJAM-C (185)), erhöht. Im Laufe des aktiven Stadiums geht die Endothelzellaktivierung in eine Schädigung, begleitet von einem Kapillarverlust, einer verminderten Kapillarreparatur und einem anti-angiogenetischen Milieu, über. SSc-Patienten im späten Stadium der Kapillarveränderungen zeigten erhöhte Serumspiegel von Matrix-Metalloproteinasen und der anti-angiogenetische Isoform des VEGF-B sowie Angiopoetin-2 (105, 218, 233). Diese Arbeiten unterstützen weiterhin die Endothelzell-zentrierte Hypothese zur Pathophysiologie der SSc. Jedoch konnte auch in den hier untersuchten Patienten kein direkter Zusammenhang zwischen dem Kapillarstatus und dem Erkrankungsstadium nachgewiesen werden. Korrelationsanalysen bezüglich der später untersuchten möglichen Biomarker und der Kapillarmuster der SSc-Patienten ergaben keinen Zusammenhang zwischen diesen Parametern. Da ebenso in der aktuellen Literatur keine eindeutigen Hinweise auf eine Verbindung der Ausprägung der Kapillarschädigung und dem Krankheitsverlauf der Sklerodermie zu finden waren, wurde die Einteilung in die Stadien nicht weiterverfolgt. Die Kapillarmikroskopie wurde weiterhin als diagnostisches Mittel verwendet, da die Sensitivität und Spezifität der Kapillarmikroskopie derart hoch ist, dass es sich in Kombination mit dem Nachweis von

Auto-Antikörpern im Vergleich zu anderen Parametern für eine zeitige Diagnose der SSc eignet (81, 82).

In beiden SSc-Kollektiven erhielten 37,7 % der Patienten eine immunsuppressive Therapie mit Methotrexat, Azathioprin oder Prednison. Dies, ebenso wie die Behandlung des 2.RP mit den Vasodilatoren Iloprost, Nifepedin, Bosentan und Sildenafil, entspricht den Empfehlungen der EULAR/EUSTAR (96). Üblicherweise erhalten zwischen 28 % und 47 % der SSc-Patienten eine immunsuppressive Therapie (234, 235). Auf Grund der mannigfaltigen Begleiterkrankungen ist die Medikation der analysierten Sklerodermie-Patienten recht heterogen. Dies ist jedoch nicht unüblich bei SSc-Patientenkollektiven.

Die für die Sklerodermie-typischen Komorbiditäten finden sich in den schwedischen und deutschen Patienten in ähnlicher Häufigkeit, d. h. für die lcSSc in wenigen Fällen, wie in bereits vorgestellten SSc-Kohorten (Tabelle 12). Dazu zählen die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), digitale Ulzerationen, die interstitielle Lungenerkrankung (ILD) und die *Calcinosis cutis*. Bei bis zu einem Viertel aller lcSSc-Patienten treten Kalziumsalzablagerungen in der Haut auf (57). Bei den für diese Arbeit rekrutierten Patienten konnte bei bis zu 15 % eine *Calcinosis cutis* dokumentiert werden. Eine Arthritis lag je nach Subgruppe bei 4,3 % bis 13,3 % der Patienten vor. Dies steht im Einklang mit einer Arthritis-Rate von 5 % bis 20 % bei SSc-Patienten (55, 63, 68). Die Lungenbeteiligung war bei dcSSc-Patienten (ILD: 55%) stärker ausgeprägt als bei den unterschiedlichen lcSSc-Subgruppen (39,1 % bis 46,7 %). Dafür spricht, dass es bei der dcSSc früher zu einer Organbeteiligung, hier der Lunge, kommt, als bei der lcSSc (72). Dies macht deutlich, dass es keine klar definierte Grenze zwischen der lcSSc und der dcSSc gibt und sich eine Klassifizierung der SSc anhand der klinischen Symptome als unzureichend gestaltet. Ähnlich verhält es sich bei den bisher vorgeschlagenen, serologischen Biomarkern für die SSc: Dass sich die SSc-Subtypen anhand ihres Auto-Antikörperstatus unterscheiden lassen, wird zurzeit intensiv diskutiert. Während anfänglich von einer Dominanz der Anti-Scl-70- und der Anti-RNA-Polymerase-Antikörpern bei der dcSSc ausgegangen und der lcSSc eher ein Anti-Zentromeres-Antikörperprofil zugeschrieben wurde (6, 236), lassen einige neuere Studien eine leicht veränderte Zuordnung der Auto-Antikörper und der beiden Subtypen erkennen (237). So konnte gezeigt werden, dass Anti-Scl-70-Antikörper, welche ursprünglich der dcSSc zugeordnet wurden, eher mit der Manifestierung von digitalen Ulzerationen einhergehen. Für alle hier untersuchten SSc-Patienten konnte ein hoher ANA-Titer nachgewiesen werden. Die hier untersuchten lcSSc-Patienten zeigten unerwarteter Weise ein relativ hohes Vorkommen an, dem für die dcSSc-typischen, Anti-Scl-70-Autoantikörpern. Da diese Patienten neben den

Anti-Scl-70-Antikörper ebenso hohe Titer der lcSSc-typischen Auto-Antikörper aufweisen und das Ergebnis des Antikörper-Nachweis abhängig von der Methode ist, sind diese Befunde eher auf Interassay-spezifische Unterschiede zurückzuführen.

Im Allgemeinen kann man zusammenfassen, dass die hier beschriebenen Kollektive von lcSSc- und dcSSc-Patienten sich in der epidemiologischen Zusammensetzung sowie in dem Auftreten von Begleiterkrankungen und der durchgeführten Medikation nicht wesentlich von bereits beschriebenen Kohorten unterscheiden.

8.2. Proteinanalytik des SSc-Patientenserums mit Fokus auf IL-33 und seinem Rezeptor ST2

Nach der grundlegenden klinisch-epidemiologischen Charakterisierung der Studienkohorte wurden die gewonnenen Blutproben bezüglich ihres IL-33- und sST2-Gehalt untersucht. Weder die lcSSc-, noch die dcSSc-Patienten wiesen erhöhte IL-33-Serumkonzentrationen auf. Dafür zeigten spezifisch lcSSc-Patienten mit einer Erkrankungsdauer von mehr als neun Jahren signifikant erhöhte sST2-Spiegel.

Die IL-33/ST2-Achse wurde aus mehreren Gründen als Signalweg für potentiellen Biomarkern ausgewählt: Bereits 2009 zeigten Yanaba *et al.*, dass IL-33 im Serum einer kleinen SSc-Kohorte erhöht war und mit dem Ausmaß der Hautbeteiligung korrelierte (184). Kurze Zeit später folgte eine Studie, die die erhöhten IL-33-Serumspiegel den frühen Krankheitsstadien der Sklerodermie zuordnete (19). Diese ersten Hinweise deuteten auf eine vielversprechende Beteiligung von IL-33 in den frühen, molekularen Prozessen der SSc hin. Des Weiteren wurde im Tiermodell gezeigt, dass subkutane IL-33-Injektionen zu einer Akkumulation von Eosinophilen sowie CD3⁺-Lymphozyten in der Haut und einer dermalen Fibrose führen (238).

Eine weitere Studie bei SSc-Patienten zeigte, dass IL-33 und sein Rezeptor ST2 in SSc-Hautbiopsien ungewöhnlich exprimiert wurden (169). IL-33 liegt in dermalen Endothelzellen und Fibroblasten von gesunden Individuen im Nukleus der Zelle vor. Zu Beginn der Sklerodermie konnten keine oder nur eine sehr geringe Mengen des IL-33-Proteins im Zellkern der Endothelzellen nachgewiesen werden. Dafür war im Gegensatz zu gesunden Probanden die Expression der IL-33-mRNA ähnlich oder sogar um ein Vielfaches erhöht. Es ist bekannt, dass Endothelzellen bei Schädigung oder pro-inflammatorischer Aktivierung IL-33 freisetzen. Dies und die erhöhten IL-33-Serumspiegel bei SSc-Patienten

deutet daraufhin, dass Endothelzellen in der SSc eine normale IL-33-Produktion aufweisen, das Zytokine jedoch nach pro-inflammatorischer Stimulierung oder Schädigung in großen Mengen in die Zirkulation freisetzen. IL-33 könnte in diesem Falle als „Alarmin“ wirken. Dazu passt, dass in dem frühen Stadium der Sklerodermie der IL-33-Rezeptor auf den Endothelzellen und Fibroblasten verstärkt exprimiert wird. Dies würde eine schnelle und effektive Weitergabe des Alarmsignals in den, von der Entzündung oder Schädigung betroffenen Gebieten gewährleisten. Zusätzlich wirkt IL-33 auf Makrophagen, Mastzellen sowie T- und B-Lymphozyten. Dabei lockt es Th2-Immunzellen an und stimuliert diese zur Differenzierung, woraufhin diese Immunzellen pro-fibrotische Zytokine, u. a. IL-13, produzieren (164, 239). Parallel zu dieser Arbeit zeigten Terras *et al.* 2013, dass bloß in 32 % der untersuchten deutschen SSc-Patienten IL-33 im Serum festgestellt werden konnte (240). Dennoch waren die IL-33-Serumkonzentrationen im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Sie korrelierten weder mit dem Alter, dem mRSS, dem Vorliegen einer PAH noch dem SSc-Subtyp, sondern ausschließlich mit dem Vorkommen digitaler Ulzerationen. Interessanterweise konnten Terras *et al.* nicht den Zusammenhang zwischen dem frühen Kapilarmuster und erhöhten IL-33-Serumspiegel wie bereits Manetti *et al.* sie nachgewiesen hatten, zeigen (241).

Neben diesen klinischen und experimentellen Evidenzen war für eine Beteiligung der IL-33/ST2-Achse in der frühen Pathophysiologie der Sklerodermie ebenso die Funktion und Lokalisierung des IL-33-Signalwegs für die Auswahl als Untersuchungsziel ausschlaggebend. IL-33 wird hauptsächlich in Epithel- und Endothelzellen, sowie glatten Muskelzellen und Fibroblasten exprimiert (165–167). Wie bereits erwähnt, ist IL-33 in ruhenden Endothelzellen im Nukleus lokalisiert und wird bei Schädigung oder Aktivierung der Endothelzelle aus derselben freigesetzt. In der Zirkulation oder in dem umliegenden Gewebe erfüllt IL-33 anschließend eine Alarm-gebende Funktion. Dieses Signal wird von ST2-positiven Zellen, darunter EC, Fibroblasten oder Th2-Immunzellen, aufgenommen. Die IL-33-Wirkung beruht daher auf einer Endothelzell-intrinsischen „Alarmin“-Funktion und wird bei Schädigung der Endothelzellbarriere aktiviert.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei SSc-Patienten und den ausgewählten Kontrollgruppen der IL-33-Serumspiegel mittels ELISA analysiert. Um einen genauere Beschreibung des Krankheitsverlaufs zu ermöglichen, wurden die lcSSc-Patienten anhand ihrer Krankheitsdauer in drei weitere Untergruppen eingeteilt.

Es konnte weder für die einzelnen Untergruppen, noch für die Gesamtheit der lcSSc-Patienten ein erhöhter IL-33-Serumspiegel nachgewiesen werden (Abbildung 16). Leicht

höhere IL-33-Mittelwerte fanden sich bei den LeRoy- und den dcSSc-Patienten. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten von Manetti *et al.* und Terras *et al.* (240, 241). Jedoch unterstreichen sie den Trend, den bereits Terras in ihrer Arbeit beschrieb. Während Manetti *et al.* in ungefähr 58% der SSc-Patienten IL-33 im Serum nachweisen konnte, fand sich in nur ein Drittel der deutschen SSc-Patienten nachweisbares IL-33. Weiterhin zeigten nur diese IL-33-positiven Patienten stark erhöhte IL-33-Werte. Dies konnte ebenso bei den hier untersuchten SSc-Patienten beobachtet werden. Wenn Patienten IL-33-positiv waren, konnte eine, im Vergleich zu den restlichen Individuen der Subgruppe, um bis zu zehnfach erhöhte IL-33-Serumkonzentration gemessen werden. Inwieweit die von Terras *et al.* angesprochenen unterschiedlichen Spezifität der Test oder der „Cut-off-Level“ für diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich ist, lässt sich nicht abschließend beantworten. Ebenso wie von beiden Forschern wurde hier ein ELISA-basierten Test zur IL-33-Analyse verwendet. Je nach Hersteller, unterscheiden sich die Sensitivität und der Nachweisbereich erheblich voneinander. Die wurde für die Analyse des IL-33-verwandte IL-1 β bereits ausführlich von du Pont *et al.* diskutiert (242). Es muss, aufgrund der spezifischen Mechanismen der Prozessierung des IL-33-Moleküls, klar gesagt werden, dass die Messung immunoreaktiven IL-33 keine Rückschlüsse auf die biologische Aktivität des Zytokins zulassen (243). Daher ist, ähnlich zu IL-1, die Messung mit einem Bioassays sinnvoll. Dieser wird zurzeit in unserem Labor entwickelt (F. Ottenlinger, pers. Mitteilung). Wahrscheinlich ist zusätzlich, dass bei den untersuchten SSc-Patienten weitere Begleiterkrankungen vorlagen, die nicht umfassend analysiert wurden, und die für die sowohl bei Manetti und Terras als auch bei den hier untersuchten SSc-Patienten die Ursache für die erhöhten IL-33-Spiegel sind. So zählen zu den Erkrankungen, die nachweislich das IL-33 im Blut erhöhen, allergisches Asthma, allergischer Rhinitis oder atopischen Erkrankungen (244–246).

Die Serumproben wurden ebenfalls auf den sST2-Gehalt analysiert. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als neun Jahren deutlich höhere sST2-Serumspiegel als Patienten in früheren Krankheitsstadien oder die dcSSc-Gruppe aufweisen (Abbildung 16). Dies konnte sowohl per ELISA als auch beispielhaft für vier untersuchte lcSSc-Patienten in einem unabhängigen Protein-Array nachgewiesen werden (Abbildung 17). Lösliches ST2 wurde bereits in vielen fibrotischen Erkrankungen als Marker beschrieben. Darunter auch 2013 in unserer Arbeitsgruppe von Bergis *et al.* (4) in der Leberzirrhose. Interessanterweise war sST2 im Serum von Patienten mit Leberzirrhose stärker erhöht als in Patienten mit einem

Leberzellkarzinom. Dies lässt vermuten, dass die fibrotische Umstrukturierung der Leber der Anstoß zur Produktion und Freisetzung von beträchtlichen Mengen an sST2 ist.

Ein weiterer Zusammenhang scheint zwischen der Aktivierung des ST2-Gens und dem Voranschreiten der Lungenfibrose zu bestehen. So konnten Tajima *et al.* in einem Mausmodell und humanen Lungenepithelzellen und -fibroblasten zeigen, dass eine Induktion der Lungenfibrose innerhalb weniger Tage zu einem Anstieg der ST2-mRNA in der Lunge führt (247). Die ST2-mRNA korrelierte dabei mit der Expression der TGF- β -mRNA. Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen der ST2-Genaktivität und dem Entstehen der Fibrose vermuten und stehen im Einklang mit den Ergebnissen der verstärkten ST2L-Expression und -Lokalisierung in dermalen Endothelzellen zu Beginn der Sklerodermie (169). Die Resultate zu sST2 und ST2L sind differenziert zu betrachten. ST2L ist der funktionale Membranrezeptor für IL-33 und aktiviert den dazugehörigen intrazellulären Signalweg. Das lässt vermuten, dass seine Expression und Präsentation entsprechend zu der, außerhalb der Zelle vorliegenden, IL-33-Konzentration reguliert werden. Dies erklärt die hohen Konzentrationen von ST2L in Endothelzellen und Fibroblasten der SSc-Patienten. Sie stellen eine Reaktion auf die Freisetzung des IL-33 dar. Welche Funktion sST2 in der systemischen Sklerose einnimmt, ist bisher unklar. Höchst wahrscheinlich wird es, wie bereits beschrieben (248–250), als „Abbau-Rezeptor“ für, nach einer EC-Schädigung freigesetztes IL-33 fungieren. So könnten die in der Sklerodermie nachweislich erhöhten Spiegel von zirkulierendem IL-33 von sST2 gebunden und neutralisiert werden. Ein rascher Abbau des IL-33 könnte die niedrigen Serumkonzentrationen in der hier, als auch in der von Terras *et al.* untersuchten SSc-Kohorte erklären. Der IL-33-Abbau könnte dadurch die Induktion von Th2-Immunzellen anhalten und eine daraus resultierende verringerte Invasion dieser Zellen in das betroffene Gebiet zur Folge haben. Weiterhin würde die Produktion von Th2-Zytokinen, IL-4, IL-4 und IL-13, verhindert. Damit wäre die von Rankin *et al.* beschriebene fibrotische Induktion von IL-33 mittels IL-13 (in der Lunge) unterbunden (238).

Einen sehr interessanten Befund präsentierten Martinez-Martinez *et al.* kürzlich in adipösen Ratten (251). Diese Tiere zeigten in der Aorta eine erhöhte Transkription von sST2, welche mit einer verstärkten vaskulären Fibrose korrelierte. ST2L hingegen wurde auf mRNA-Ebene wesentlich geringer exprimiert als bei der Kontrollgruppe. *In vivo* wurde dieser Zusammenhang in vaskulären Fibroblasten bestätigt. Eine sST2-Stimulation dieser Fibroblasten, resultierte in einer erhöhten Produktion von Kollagen I und weiteren pro-fibrotischen Faktoren. Damit zeigte sST2 eine ECM-regulierende und schädliche,

pro-fibrotische Wirkung. Betrachtet man die sST2-Serumspiegel der hier analysierten SSc-Patienten unter diesem Gesichtspunkt, eröffnet sich eine neue Interpretation der sST2- und IL-33-Serumspiegel. Vermutlich erfüllt sST2 zu Beginn der Sklerodermie eine protektive Rolle indem es das in großen Mengen freigesetzte IL-33 neutralisiert und eine pro-inflammatorische Th2-Antwort unterbindet. Im späteren Verlauf der Erkrankung, kommt es dann zu einer Umkehr dieser Schutzfunktion: sST2 wirkt pro-fibrotisch indem es die ECM-Synthese erhöht.

Die Ergebnisse von Manetti *et al.* und Vettori *et al.* zeigen, dass in dem späten Stadium der SSc eine verringerte, den gesunden Probanden ähnliche IL-33-Serumkonzentration (19, 241) vorliegt. Kurze Zeit zuvor wiesen Manetti *et al.* nach, dass nach längerer Krankheitsdauer die IL-33-Konzentration in Endothelzellen geringer ist als in gesunden Probanden (169). Dies könnte zusammen mit den Ergebnisse von Shao *et al.* die hier im späten Stadium der SSc nachgewiesenen sST2-Serumspiegel erklären (252). Nukleär lokalisiertes IL-33 supprimiert die Transkription von sST2 in humanen Endothelzellen indem es an den ST2-Promotor bindet. Geringere Mengen an nukleären IL-33 im späten Sklerodermie-Stadium könnten somit einen Anstieg der sST2-Expression und den daraus resultierenden erhöhten Serumspiegel zur Folge haben. Die Konsequenz der erhöhten sST2-Serumspiegel, könnte ein Verlust der protektive Wirkung von sST2 sein. Dafür könnte das zirkulierende sST2 bei umliegenden Fibroblasten die Kollagen-Synthese aktivieren und seine schädliche, pro-fibrotische Wirkung, wie von Martinez-Martinez *et al.* beschrieben (251), entfalten. Dass die Regulation der sST2-Expression anders als die von ST2L erfolgt, wird zusätzlich von den Ergebnissen von Martinez-Martinez *et al.* unterstützt. Sie konnten eine unterschiedliche Expression von ST2L und sST2 in den vaskulären Fibroblasten unter fibrotischen Bedingungen nachweisen (251).

Im Gegensatz dazu konnte bei den Korrelationsanalysen zwischen dem Serumgehalt von sST2 und Dermatofibrosemarkern (COMP, Lysyl-Oxidase) sowie dem mRSS kein Zusammenhang festgestellt werden (Tabelle 14). Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu der oben erwähnten dualen Rolle von sST2. Da es sich bei sST2 zu Beginn der Sklerodermie um einen anti-inflammatorischen Faktor handelt, muss der sST2-Serumspiegel in den frühen Stadien der Erkrankung nicht unbedingt mit der Hautbeteiligung korrelieren. In den späten Phasen der SSc, wenn sST2 eine pro-fibrotische Wirkung entfaltet, beschränkt sich diese hauptsächlich auf Endothelzellen und vaskuläre Fibroblasten. Eine Untersuchung des Ausmaßes der vaskulären Fibrose und deren

Korrelation mit der sST2-Serumkonzentration wäre ein wichtiger, nächster Schritt in der Validierung von sST2 als diagnostischer Biomarker bei der SSc.

Für die pro-fibrotische Rolle von sST2 auf vaskulärer Ebene sprechen ebenfalls die Ergebnisse aus der Serumanalyse von SSc-Patienten mit Iloprost-Therapie. Unter dem Handelsnamen Iloprost ist der Wirkstoff Treprostinil erhältlich. Dabei handelt es sich um ein stabiles Prostazyklin-Analog, welches vasodilatorisch auf die glatten Muskelzellen der Blutgefäße wirkt. Des Weiteren hemmt es die Thrombozytenaggregation. Bei der Sklerodermie wird es als potenter Vasodilatator eingesetzt, um die Mikrozirkulation der äußeren Extremitäten zu verbessern und die Heilung digitaler Ulzerationen zu beschleunigen.

Bei fast allen SSc-Patienten war ein Rückgang der sST2-Serumkonzentration nach der fünftägigen Iloprost-Behandlung zu verzeichnen (Abbildung 33). Die Patienten beschreiben nach der Medikation nachlassenden Schmerzen, eine gesteigerte Beweglichkeit sowie eine bessere Durchblutung der äußeren Extremitäten, insbesondere der Finger. Interessanterweise berichten viele SSc-Patienten von einer langanhaltenden Beschwerdebesserung über Wochen bis hin zu Monaten, welche in keiner Weise der direkten Pharmakokinetik von Iloprost entspricht (253, 254). Nachweislich verringert eine Iloprost-Behandlung die Anzahl an Megakapillaren (255), während es zeitgleich anti-inflammatorisch wirkt (256). Möglicherweise hat die vasodilatorische Wirkung von Iloprost einen zusätzlichen positiven Effekt auf die geschädigten Endothelzellen. Für eine direkte Wirkung von Iloprost auf die Endothelzellen sprechen erste in vivo Ergebnisse (257), die belegen, dass Iloprost die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen verringert und damit die Lymphozytenadhäsion reduziert. Des Weiteren spricht für eine direkte EC-Wirkung von Iloprost, dass sich nach einer Therapie die Anzahl an zirkulierenden Endothelvorläuferzellen im Blut deutlich erhöht und sich das Transkriptionsprofil der Endothelzellen der Blutgefäße deutlich verändert (258). Dies wiederum könnte zu einer verringerten IL-33-Ausschüttung und darauffolgenden einer verminderten sST2-Produktion und -Sekretion führen. Da sich die hier behandelten Patienten bereits im fortgeschrittenen Stadium der Sklerodermie befinden, dürfte damit der beginnende pro-fibrotische Effekt von sST2 gedämpft werden und den langen Zeitraum, in dem die Symptome wesentlich verbessert sind, erklären.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sST2 nicht nur im späten Stadium von lcSSc-Patienten im Serum erhöht ist, sondern ebenso dass der sST2-Spiegel nach einer Iloprost-Therapie bei den meisten Patienten rückläufig ist. Diese Ergebnisse deuten auf eine duale Funktion

von sST2 in der systemischen Sklerose hin. Zu Beginn der Erkrankung ist es sehr wahrscheinlich, dass sST2 als „Abbaurezeptor“ für das pro-inflammatorische IL-33 agiert, während es im Verlauf der Sklerodermie und einer Abnahme der IL-33-Sekretion eine eigenständige, schädliche Wirkung entfaltet. In den späten Phasen der Erkrankung scheint es, dass sST2 sich verstärkend auf die vaskuläre Fibrose und die ECM-Umbildung auswirkt. Damit eignet sich sST2 als symptomspezifischer Verlaufsmarker für die Fibrose der Vaskulatur.

Um eine tiefergehende Einsicht in den molekularen Mechanismus von sST2 im Verlauf der Sklerodermie zu erhalten, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Möglicherweise eröffnet die IL-33/ST2-Achse ein neues therapeutisches Interventionsziel für die Sklerodermie. Dieser Frage wird zurzeit mittels Kollokalisationsstudien in Hautbiopsien von SSc-Patienten in Zusammenarbeit mit PD Dr. Klaus Scholich (MELK, Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Frankfurt) nachgegangen. Aufgrund der schwierigen Probengewinnung liegen dazu zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Ergebnisse vor.

8.3. Analyse der Sphingolipid-Profil in SSc-Patienten

Die Sphingolipide waren zunächst ausschließlich als Strukturbestandteil der Zellmembran bekannt. Erst in den letzten Jahren wurde ihre Bedeutung als aktive Lipidmediatoren herausgearbeitet. Aktuellere Forschungsergebnisse zeigen, dass sie als *second messenger* eine essentielle Rolle in physiologischen sowie pathophysiologischen Vorgängen einnehmen (122, 206, 257, 259, 260). Insbesondere die vielfältigen Funktionen von C1P und S1P standen bisher im Fokus der Forschung.

Der Metabolismus der Sphingolipide ist bereits mehrfach detailliert beschrieben worden (261–263). Deshalb erfolgt nachfolgend eine gekürzte Darstellung der S1P-Synthese, die für diese Arbeit von Bedeutung ist: S1P entsteht durch die Phosphorylierung von Sphingosin. Die *de novo* Synthese läuft über die Enzyme Sphingosinkinasen 1 und 2 ab. Weiterhin kann S1P durch zwei S1P-Phosphatasen zu Sphingosin dephosphoryliert und abermals über die Sphingosinkinasen in S1P umgesetzt werden. Dies ist der sogenannten „*salvage pathway*“. Der S1P-Gehalt wird durch die Sphingosinkinasen, die S1P-Phosphatasen und die S1P-degradierende S1P-Lyase strikt kontrolliert. Die Aufrechterhaltung des, im menschlichen Körper etablierten, S1P-Gradienten für viele physiologische Prozesse von großer Bedeutung (3, 151, 264). Für die Immunzellmigration ist dieser Gradient wichtig, da Lymphozyten im Thymus die niedrigen

S1P-Konzentrationen mittels des S1P-Rezeptoren (S1PR1) wahrnehmen und entlang des Gradienten in die Blutgefäße migrieren (207). Aufgrund der hohen S1P-Konzentrationen im Blut wird der S1P-Rezeptor internalisiert und erst wieder präsentiert, wenn die Zelle in das periphere Gewebe, in dem eine niedriger S1P-Konzentration vorliegt, migriert. Weiterhin fungiert S1P extrazellulär als pro-angiogenetischer Stimulus und Überlebensfaktor (260). Intrazellulär kann es ebenso die pro-apoptotische, Seneszenz- sowie Autophagie-fördernden Effekte von seine Vorläufermoleküls Ceramid inhibieren.

In dieser Arbeit wurden die Sphingolipide-Profile der SSc-Patienten, insbesondere der S1P-Serumspiegel, im Hinblick auf mögliche Veränderungen im Vergleich zu gesunden Probanden untersucht. Ziel dieser Analyse war es die Eignung der Sphingolipide als potentielle diagnostische Biomarker zu überprüfen. Erste Publikationen wiesen im Vorgang dieser Arbeit auf eine pathophysiologische Beteiligung der Sphingolipide hin. Tokumura *et al.*, zeigten, dass in wenigen SSc-Patienten die S1P-Serumspiegel verglichen mit gesunden Probanden signifikant erhöht waren (142). Zusätzlich zeigte S1P eine pro-fibrotische Wirkung in der Niere und der Leber (129, 130). Neuere Studien konnten außerdem nachweisen, dass, durch die Sphingokinase 1 produziertes, S1P die Lungenfibrose in einem Bleomycin-Mausmodell erheblich verstärkt, während ein Ausschalten der S1P-Lyase eine Verschlechterung der Fibrose zur Folge hat (136). *In vitro* Experimente in humanen Myofibroblasten der Lunge belegten die Induktion der Expression von ECM-Komponenten mittels S1P über die Rezeptoren S1PR2 und S1PR3 und somit eine eindeutig pro-fibrotische und die EndMT-aktivierende Rolle von S1P (135). Für das dem S1P verwandten dhS1P ist klar, dass es über die Aktivierung des PTEN/Smad3-Signalwegs die Kollagen-Synthese hemmt und dadurch anti-fibrotisch auf humane Fibroblasten wirkt (139). Dieser kurze Einblick in die gegenwärtige Literatur bezüglich S1P sowie seinen fibrotischen Eigenschaften in den unterschiedlichen Organen und Zelltypen, verdeutlicht, dass eine Beteiligung von S1P in den progressiven, fibrotischen Veränderungen in der Sklerodermie naheliegend ist und die Möglichkeit besteht, dass sich Moleküle des Sphingolipid-Signalweges als Biomarker für die Sklerodermie anbieten.

Zu Beginn der Arbeit wurden Serumproben von schwedischen und deutschen SSc-Patienten auf ihren S1P-, Sphingosin- und dhS1P-Gehalt analysiert (Abbildung 18). Wie weiter unten in der Diskussion nochmals aufgegriffen wird, stellte sich heraus, dass sich die schwedischen und deutschen lcSSc-Patienten und die gesunden Probanden signifikant in den Serumspiegel der amphiphilen Spezies, S1P und dhS1P, unterschieden. Die rein lipophilen Sphingosin-Serumspiegel bewegten sich demgegenüber in der schwedischen und deutschen Kontrollgruppe sowie den gemischt zusammengesetzten lcSSc-

Patientengruppen (Patienten mit einer Krankheitsdauer von vier bis neun Jahren und Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als neun Jahren) in sehr ähnlichen Konzentrationsbereichen. Kurz nach der Manifestation der SSc weisen die lcSSc-Patienten die höchsten Sphingosinwerte auf, während die Serumkonzentration im späteren Stadium wieder leicht absinkt. Im Vergleich zur lcSSc zeigte sich bei den dcSSc-Patienten ein, im Vergleich zu den gesunden Probanden, leicht erhöhter Sphingosin-Serumspiegel, der dennoch geringer war als der der lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von vier bis neun Jahren. Aufgrund der Differenz der S1P- und dhS1P-Spiegel zwischen den schwedischen und deutschen Individuen erfolgten weitere Analysen, um zu klären inwieweit die Ergebnisse dieser Sphingolipid-Profile glaubhaft waren. Dabei brachte eine erneute Untersuchung beider Kontrollgruppen zum Vorschein, dass sich die Seren der gesunden Individuen ausschließlich signifikant in ihrem S1P-Gehalt unterscheiden, während die verbleibenden analysierten Ceramide sowie dhS1P und Sphingosin eine sehr ähnlich Verteilung aufwiesen (Abbildung 20). Es ist bekannt, dass die Extraktion des polaren S1P aus Blut deutlich schwieriger ist als die von unpolaren Sphingolipiden wie z. B. dem Sphingosin (265). Die Verwendung einer angesäuerten Chloroformlösung für die Extraktion kann dieses Problem umgehen und die S1P-Wiederfindungsrate wesentlich erhöhen. Da eine zweifache, saure Chloroform-Extraktion für alle Serumproben verwendet wurde, kann ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede in den S1P- und dhS1P-Serumkonzentrationen auf eine unzureichende Extraktion zurückzuführen sind. Ein in der Literatur häufig diskutierter Einwand ist die Stabilität von S1P in Vollblut bzw. Serum. Obwohl viele Studien, die Sphingolipid-Profile untersuchen, Serum als Untersuchungsmatrix verwenden, wird Plasma als optimaleres Probenmaterial empfohlen. Diese Empfehlung beruht darauf, dass S1P im Plasma bei Raumtemperatur für vierundzwanzig Stunden stabil ist, während es im Vollblut nach wenigen Stunden angereichert ist (266). Grund dafür ist die Lyse von Erythrozyten und Blutplättchen, in denen ein großer Teil des biologisch-verfügbaren S1P gespeichert wird (264). Um diese Problematik zu umgehen, empfehlen Scherer *et al.* eine schnelle Aufbereitung der Blutproben und Aufbewahrung der Proben bei - 80 °C. Die in Frankfurt gewonnen Proben verblieben entsprechend den Empfehlungen direkt nach der Blutentnahme für 30 Minuten bis maximal 1 Stunde bei Raumtemperatur zur Gerinnung und wurden anschließend aufbereitet und entsprechend aufbewahrt. Laut Angaben der schwedischen Biomaterialbank und den beteiligten Ärzten wurden mit den schwedischen Serumproben genauso wie mit den deutschen Proben verfahren. Ein bisher ungeklärter Punkt in der Probenhandhabung ist der Versand der Proben von Stockholm nach Frankfurt. Die Proben wurden auf Trockeneis verschickt und kamen offensichtlich gekühlt in Frankfurt an. Ob die

Temperatur während des Transports konstant geblieben ist, konnte aufgrund einer fehlenden Temperaturopzeichnung nicht nachverfolgt werden. Die Proben könnten während der Beförderung einer schwankenden Temperatur unterlegen haben, die sich negativ auf die Probenintegrität ausgewirkt hatte. Es ist aber ebenso denkbar, wenn auch noch nicht berichtet, dass ein genereller Unterschied in den S1P- und dhS1P-Serumspiegeln von schwedischen und deutschen Individuen existiert. Um diese zu berücksichtigen wurden alle gemessenen S1P-, dhS1P- sowie Sphingosin-Serumspiegel der SSc-Patienten auf den Mittelwert der landesspezifische Kontrolle genormt (Abbildung 21). Dabei konnte kein Unterschied zwischen dem S1P- und dhS1P-Serumspiegel der lcSSc-Patienten und der Kontrolle ermittelt werden. Der bereits für Sphingosin beschriebene signifikante Anstieg zu Beginn der Sklerodermie konnte erneut dargestellt werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass schwedische und deutsche Individuen einen von Grund auf unterschiedlichen S1P-Basalserumspiegel haben. Dennoch scheint die Serumkonzentration des stabileren Sphingosin zu Beginn der Erkrankung dereguliert und resultierte in einem erhöhten Serumspiegel bei den lcSSc-Patienten. Eine ähnliche Deregulation der S1P-Konzentrationen bekräftigen die nachfolgend diskutierte Plasmawerte und die durchgeführte Normierung und Angleichung S1P-Resultate der schwedischen und deutschen Proben (siehe 7.3.5). Anzumerken ist, dass Serum zu Beginn als Untersuchungsmaterial ausgewählt wurde, weil es in der Routineblutentnahme wesentlich einfacher gewonnen und weiterverarbeitet werden kann.

Zu Anfang der Sphingolipid-Untersuchungen des Plasmas wurden die S1P-Konzentrationen einiger deutscher und schwedischer lcSSc-Patienten, von denen sowohl Plasma als auch Serum vorlag, analysiert (7.3.5). Entgegen den Resultaten von Hammad *et al.*, waren die S1P-Werte im Plasma nicht um den Faktor 2,19 niedriger als im Serum (Abbildung 25) (212), sondern bei den deutschen Patienten nur geringfügig niedriger (Faktor 1,13) und bei den schwedischen Individuen um den Faktor 3,83 erhöht. Festzuhalten ist, dass sich keine der hier untersuchten Kohorten in ihrem S1P-Serum/S1P-Plasma-Verhältnis mit den bereits publizierten Resultaten deckte (212, 266, 267).

Anschließend wurden neben den Sphingolipiden S1P, dhS1P und Sphingosin eine Vielzahl an Ceramide und die Glucosyl-Ceramide C16:0- und C24:1-Glucosylceramid in den Plasmaproben analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Ceramide C18:0, C24:1 sowie C16:0-Dihydroceramid in den lcSSc-Patienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht war (Abbildung 22). Interessanterweise war in diesen 171 Patienten S1P-Konzentration höher als die der gesunden Individuen (Abbildung 23). Obwohl der

Sphingosin-Spiegel in den lcSSc-Patienten nicht signifikant erhöht war, wies eine gewisse Subpopulation der Patienten eine wesentlich gesteigerte Sphingosin-Plasmakonzentration auf. Anscheinend ist der Sphingosin-Spiegel spezifisch für eine Patientengruppierung. Welche Gemeinsamkeit diese Patienten aufweisen, konnte bisher nicht geklärt werden. Bei den ebenfalls untersuchten Glucosyl-Ceramiden war das Glucosyl-Ceramid C24:1 in den lcSSc-Patienten erhöht.

Die Resultate der Sphingolipid-Plasmaprofile verstärken die Annahme, dass die Sphingolipide an der Pathophysiologie der Sklerodermie beteiligt sind. Neben S1P und Sphingosin scheint sich diese Beteiligung sogar weiter zu erstrecken als bisher angenommen. Dihydroceramid ist das Ausgangsprodukt für die Ceramidsynthese. Das daraus resultierende Ceramid fungiert wiederum sowohl als Vorläufer für Sphingosin und S1P als auch für die Glucosyl-Ceramide. In Tumorerkrankungen und bei der zystischen Fibrose ist C18:0-Ceramide deutlich erhöht (127). Es hat eine anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung. Das C24:1-Ceramid ist im betroffenen Gewebe bei Brustkrebs, Plattenepithelkarzinomen des Nackenbereichs und bei dem Reizdarmsyndrom erhöht. Es hat einen pro-proliferativen Effekt auf Krebszellen, in dem es die Apoptose verringert. Für C16:0-Dihydroceramid und C24:1-Glucosyl-Ceramid sind bislang keine Auswirkung auf das Zellschicksal oder die Involvierung in entzündlichen sowie fibrotischen Erkrankungen bekannt. Die hohen Konzentration dieser Ceramide sowie des Glucosyl-Ceramids und des Dihydroceramids sprechen für ein Ungleichgewicht in dem gesamten Sphingolipid-/Ceramidsystem. Offensichtlich stellen C18:0-Ceramid und C24:1-Glucosyl-Ceramid ein pro-inflammatorisches Milieu in den SSc-Patienten her. Die Resultate der Sphingolipidmessung bekräftigen die Hypothese, dass sowohl S1P als auch Sphingosin im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse bei der SSc dereguliert zu sein scheinen. Die im Plasma bestätigten, erhöhten S1P-Spiegel sprechen für eine wichtige Rolle von S1P in der Pathophysiologie der Sklerodermie. Wahrscheinlich sind die erhöhten S1P-Spiegel im Blut eine Reaktion des Organismus auf die geschädigten Endothelzellen. Es ist bekannt, dass sich S1P positiv auf die Integrität der Endothelzellbarriere auswirkt und vaskuläre Leckagen vermindert (153, 268, 269). Ebenso fördert es die Neovaskularisierung (270–272). Hier passen die Ergebnisse der Iloprost-behandelten lcSSc-Patienten gut in das Bild. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, steigt die S1P- und die dhS1P-Serumkonzentration nach einer Iloprost-Medikation signifikant an (Abbildung 32). Die Behandlung mit dem Vasodilatator reguliert den oxidativen Stress in den Endothelzellen herunter indem es die Expression von Enzyme wie der Superoxiddismutase (SOD) verstärkt und die Malondialdehydkonzentration senkt (273, 274). Dies konnte sowohl in

PAH- als auch in SSc-Patienten mit 2.RP nachgewiesen werden. Die Normalisierung des oxidativen Status hat eine Verringerung der EC-Aktivität und eine Verstärkung der EC-Barriere zur Folge (258, 275–278). Zusätzlich verstärkt Hypoxie die Sphingosinkinase-1-Aktivität in Endothelzellen und stimuliert die Migration von Endothelzellen (279, 280). Die angestiegenen S1P- und dhS1P-Serumspiegel kurz nach der Iloprost-Behandlung könnte somit ein Zeichen der aktiven Reparaturprozesse in den Endothelzellen sein oder gegensätzlich aus Endothelzellen, die die Iloprost-Behandlung nicht überleben, stammen. Jedenfalls zeigt die Zunahme der Serumkonzentrationen von S1P und dhS1P, dass eine Iloprost-Therapie, deren Wirkung direkt an den Endothelzellen ansetzt, auch eine Wirkung direkt auf den Sphingolipid-Metabolismus oder die Freisetzung der beiden Sphingolipide hat. Dieser Befund verdeutlicht, dass ein Zusammenhang zwischen S1P und dem Endothelzellschaden zu Beginn der lcSSc besteht. Dass die hohen S1P-Spiegel zugleich negative Effekte nach sich ziehen, wie z. B. eine erhöhte Immunzellmigration oder die profibrotische Wirkung, ist offensichtlich. Ob und wie der Organismus diese Effekte zu mildern versucht, kann mit den bisher gewonnen Daten nicht erfasst werden. Eine Verfolgung dieser Fragestellung könnte sich im Weiteren als wesentlich für die Aufklärung der SSc-Pathophysiologie erweisen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass weder die erhöhten S1P-, noch Sphingosin-Serumspiegel oder andere Moleküle des Ceramid-/Sphingolipidmetabolismus eindeutig als eigenständige Biomarker für die frühzeitige Diagnose der lcSSc geeignet sind. Sphingosin könnte, wie erwähnt, als eigenständiger, subgruppenspezifischer Biomarker dienen. Dafür müssten weitere epidemiologische Daten der SSc-Patienten erhoben (z. B. der mRSS) und optional zusätzliche Experimente (COMP- sowie Lysyl-Oxidase-ELISA) durchgeführt werden.

Dahingegen scheint eine Verwendung von S1P als alleinstehender Biomarker unter den gegebenen Resultaten eher unwahrscheinlich. Möglicherweise könnte es eher im Zusammenhang mit weiteren Biomarkern oder Symptomen der Sklerodermie als Diagnostik eingesetzt werden. Ob es sich als Komponente eines diagnostischen Panels zur Unterstützung der SSc-Diagnose eignet, wurde anhand der Dermatofibrose-Marker COMP, Lysyl-Oxidase und des mRSS näher untersucht und im nachfolgenden Abschnitt ausführlich diskutiert.

8.4. Dermatofibrosemarker und die Korrelation mit den Sphingolipiden

Um zu überprüfen, ob die erhöhten S1P- und Sphingosinwerte in Bezug zu den fibrotischen Prozessen bei der SSc, speziell der Dermatofibrose stehen, wurden bereits etablierte Biomarker, die die fibrotischen Veränderungen der Haut dokumentieren, im Serum der SSc-Patienten erhoben. Zu diesen Markern zählten COMP, die Lysyl-Oxidase und der manuelle erhobene mRSS. Der mRSS korrelierte nicht mit S1P, dhS1P oder Sphingosin im Serum der SSc-Patienten (Tabelle 14). Aufgrund der im vorangegangenen Abschnitt erwähnten Hypothese, dass S1P zur Wiederherstellung der EC-Barriere und Abschwächung der EC-Aktivierung dient, ist ersichtlich, dass eine Korrelation zwischen dem mRSS, einem spezifischen Marker für die Dermatofibrose, und S1P für die hier vertretene Hypothese erforderlich ist.

Bei COMP handelt es sich um ein nicht-kollagenes Glykoprotein. Unter physiologischen Bedingungen liegt es als Pentamer mit fünf freien C-Termini vor. Jeder dieser Termini kann ein Kollagen I, XII oder XIV binden und dadurch die Struktur der ECM verändern (281). Schon 2006 konnte Farina *et al.* in SSc-Fibroblasten eine erhöhte COMP-Expression nachweisen (282). Kurze Zeit später postulierten Hesselstrand *et al.*, dass es sich bei COMP um einen potentiellen Biomarker für die Sklerodermie handelt (112). Dies wurde durch erhöhte COMP-Serumspiegel und Konzentrationen in Hautbiopsien von SSc-Patienten kurze Zeit später bestätigt (283, 284). COMP kann durch TGF- β induziert werden, wodurch es einen direkten Beitrag zur Fibrose nach Aktivierung des TGF- β -Signalwegs hat. Treten erhöhte COMP-Serumspiegel gleich zu Beginn auf, sind sie ebenfalls ein Maß für die Mortalität im Verlauf der Sklerodermie (114).

Die hier analysierten SSc-Patienten wiesen wider Erwarten keine erhöhten COMP-Serumkonzentrationen auf (Abbildung 27). Die Serumspiegel der SSc-Patienten wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe normiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dabei verschwand der vorher, in der nicht normierten Auftragung signifikant erhöhte COMP-Serumspiegel bei lcSSc-Patienten mit einer Erkrankungsdauer von ein bis drei Jahren verglichen mit Patienten, die eine Krankheitsdauer von über neun Jahren hatten (Abbildung 27 A). Ebenso konnte keine bzw. nur eine sehr schwache Korrelation zwischen COMP und dem mRSS nachgewiesen werden. Warum COMP in den hier untersuchten SSc-Patienten nicht erhöht war und nicht mit dem mRSS korrelierte, ist unklar. Trotz der schwachen Korrelation zwischen dem mRSS und COMP, gab es einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem COMP- und dem S1P-Serumspiegel (Tabelle 14) und eine mäßige Korrelation zwischen COMP und dhS1P

bei den lcSSc-Patienten. Warum COMP, ein klassischer Marker der Fibrose, und S1P, ein mit dem Endothelzellschaden-verknüpfter Lipidmediator, positiv miteinander korrelieren, bedarf einer weiteren Erklärungsmöglichkeit. S1P als Stabilisator der EC-Barrierefunktion, versetzt die geschädigten Endothelzellen in einen anti-oxidativen Status und vermindert kurzzeitig die Progression der Sklerodermie. Danach entfaltet es dennoch seine profibrotischen Eigenschaften bezüglich der Fibroblasten und verstärkt oder aktiviert möglicherweise die Fibrose (135). S1P aktiviert „überkreuz“, d. h. mittels Smad2/3, den TGF- β -Signalwegs, was wiederum erhöhten COMP-Serumkonzentrationen zur Folge hat (131, 133, 285).

Als weiterer Marker der Dermatofibrose wurde die Lysyl-Oxidase im Serum der lcSSc-Patienten analysiert. Die Lysyl-Oxidase ist extrazelluläres Enzym, das Kollagenfibrillen und Fibrin quervernetzt. Die ECM wird aufgrund dieser Quervernetzung äußerst stabil und kann dadurch wesentlich langsamer abgebaut werden. Erste Befunde bei einem Lungenfibrose-Model der Ratte zeigten, dass eine Reduktion der Lysyl-Oxidase eine verringerte Ausprägung der Lungenfibrose zur Folge hatte (286). Erst kürzlich konnte dieser Befund in einem Mausmodell bestätigt werden (287). Seither wird die Lysyl-Oxidase als potentieller Biomarker für das Ausmaß der Fibrose in der Sklerodermie diskutiert (110). Die hier gewonnenen Ergebnisse unterstützen tendenziell diese Aussage von Rimar *et al.* So waren die Lysyl-Oxidase-Serumspiegel der lcSSc-Patienten zwar nicht signifikant erhöht (Tabelle 14). Es war aber eine Tendenz, eine Erhöhung der Lysyl-Oxidase in den Anfang der Erkrankung, zu erfassen. Dennoch scheint die Lysyl-Oxidase ein eher „unscharfer“, unspezifischer Biomarker für die Fibrose ohne Bezug zu den ersten pathophysiologischen Prozessen. Es ist von daher nicht erstaunlich, dass die Lysyl-Oxidase-Serumspiegel weder mit dem mRSS, noch mit der S1P-Konzentration korrelieren.

All diesen Parameter (COMP, Lysyl-Oxidase, mRSS, S1P, dhS1P, Sphingosin und sST2) wurde zusätzlich auf eine Korrelation bezüglich der Erkrankungsdauer untersucht (Tabelle 15). Obwohl alle Parameter mit der Erkrankungsdauer korrelieren, bestand der stärkste, negative, Zusammenhang zwischen der Erkrankungsdauer und dem S1P-Serumspiegel. Im Gegensatz zu S1P, DKK-1 und der Lysyl-Oxidase, deren Serumkonzentrationen im Laufe der Sklerodermie abnehmen, korrelierte sST2 zwar nur mäßig, aber positiv mit der Krankheitsdauer. Die Ergebnisse bezüglich des Verlaufs der Serumkonzentrationen von S1P und sST2 sind in einer schematischen Übersicht (Abbildung 35) dargestellt.

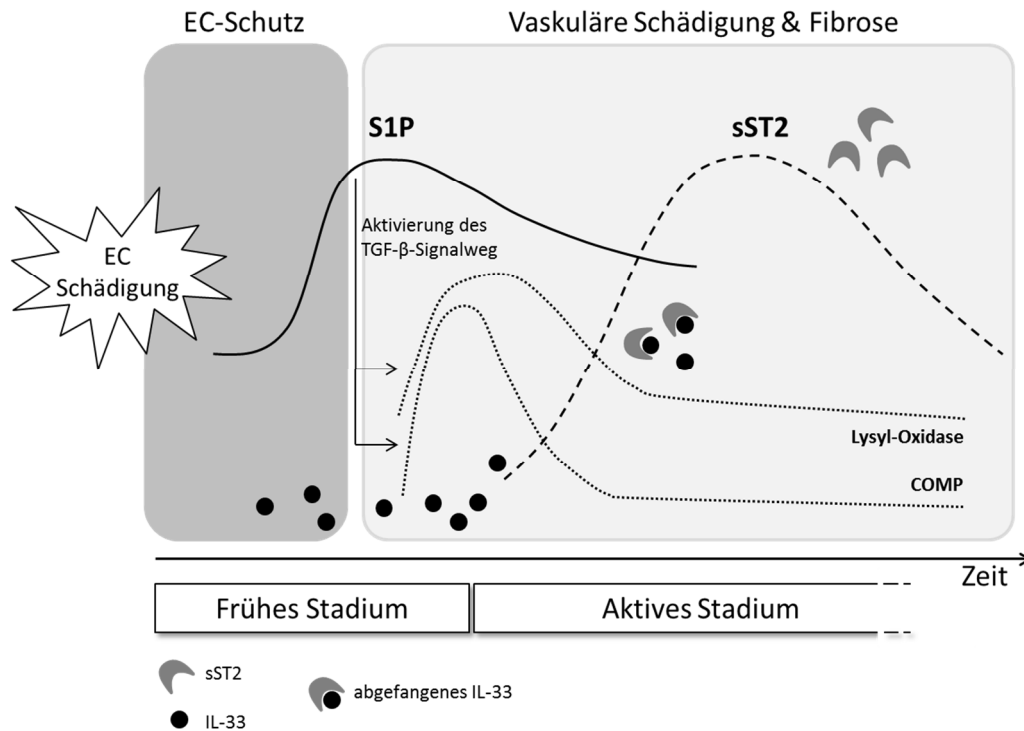


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Serumspeiegel von S1P, sST2 und der Dermatofibrosemarker COMP und Lysyl-Oxidase bezüglich im Verlauf der SSc. Kurz nach einer lokalen Schädigung der Endothelzellen wird ein EC-Barriere-förderliches Milieu generiert, in dem die S1P-Konzentration erhöht wird. Diese hohen S1P-Spiegel verursachen innerhalb kürzester Zeit eine Aktivierung des TGF- β -Signalwegs in Fibroblasten. Es kommt zu einer gesteigerten Expression an COMP und der Lysyl-Oxidase, die im Laufe der Sklerodermie leicht (COMP) bzw. moderat (Lysyl-Oxidase) zurückgehen. Parallel neutralisiert freies sST2 im Blut zirkulierendes IL-33. Nachdem das freie IL-33 vollständig abgebaut wurde, kommt es zu einer Überrepräsentation von sST2 im Blut des Sklerodermie-Patienten. Das sST2 verstärkt dann die vaskuläre Fibrose und die Umbildung der ECM. EC, Endothelzelle.

Fasst man diese Verläufe mit den explizit in Abschnitt 3.7.2.1 sowie 3.7.2.2 dargestellten Effekten von S1P und sST2 zusammen, liegt die Vermutung nahe, dass der erste S1P-Anstieg in der Sklerodermie eine positive Wirkung auf die EC-Barriere hat, sich dann jedoch in einen pro-fibrotische Effekt umwandelt. S1P aktiviert den TGF- β -Signalweg und führt damit zu einer gesteigerten COMP- und Lysyl-Oxidase-Expression. Sowohl COMP als auch die Lysyl-Oxidase tragen zu einer erhöhten fibrotischen Aktivität bei. Gleichzeitig neutralisiert zirkulierendes sST2, das durch die EC-Schädigung freigesetzte IL-33. Zu Anfang ebenfalls protektiv agierend, verändert es seine Funktion im späteren Verlauf der Erkrankung. Wenn die IL-33-Freisetzung zurückgeht, verursacht die fortwährend erhöhte Serumkonzentration von sST2 erste pro-fibrotische Veränderungen der Vaskulatur. Es kommt zu einer verstärkten Fibrose und einem pathologischen Umgestaltung der kleinen Blutgefäße.

Viele Untersuchungen zeigen, dass die Transition von Epithelzellen hinzu Myofibroblasten ein wichtiger Schritt in der Etablierung der Fibrose ist (288). In neueren Studien wird dieser Prozess ebenso für Endothelzellen in der Fibrose beschrieben (Endothelial-Mesenchymale Transition (EndMT)) (289, 290). In der hier diskutierten endothelzell-zentrierten Pathophysiologie der lcSSc, liegt deshalb die Vermutung nahe, dass nach einer anfänglichen Schädigung der EC ein Teil der verbleibenden, aktivierten EC nach einer fehlerhaften Reparatur eine Transition hin zu einem Myofibroblasten durchläuft. Bei dieser Umwandlung spielt zumindest bei anderen Zelltypen der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle. In Muskelzellen aktiviert der Wnt-Signalweg die TGF- β -Achse und aktiviert die Expression pro-fibrotischer Moleküle (291). Zugleich verstärkt eine erhöhte Konzentration des β -Catenin die Fibrose in dermalen Fibroblasten (200). Da für die SSc sowohl erste Studien auf einen deregulierten Wnt-Signalweg hinweisen (201, 202) und dieser spezifisch pro-fibrotische Programme in Fibroblasten auslösen kann, wurde die Beteiligung des Wnt-Signalweges bei der Sklerodermie anhand des Wnt-Inhibitors DKK-1 untersucht. Die durch den aktivierten Wnt-Signalweg hervorgebrachten pro-fibrotischen Vorgänge könnten durch den natürlich vorkommenden Wnt-Inhibitor DKK-1 blockiert werden. Dazu passt, wie bereits von Lafayatis zusammengefasst wurde, dass die pro-fibrotische Wirkung von TGF- β durch den Wnt-Signalweg vermittelt (292). TGF- β inhibiert DKK-1, wodurch der Wnt-Signalweg aktiviert wird. Wnt1 und Wnt10b sind in Hautbiopsien von SSc-Patienten verstärkt nachweisbar, während die DKK-1-Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden geringer ist (201).

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass DKK-1 in lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von ein bis drei Jahren im Vergleich zu Kontroll-Individuen und lcSSc-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als neun Jahren signifikant erhöht ist (Abbildung 29). Bereits in LeRoy-Patienten steigt DKK-1 an. Ebenso weisen dcSSc-Patienten eine erhöhte DKK-1-Serumkonzentration auf. Gegensätzlich zu den hier dargestellten Resultaten, wurde gezeigt, dass der Promotor von DKK-1 in SSc-Patienten durch Hypermethylierung in seiner Expression herunterreguliert ist (293). Bei genauerer Betrachtung dieser Studie zeigt sich, dass die untersuchten Patienten sich in ihrer Krankheitsdauer (im Mittel 7 Jahren) von den hier analysierten lcSSc-Patienten mit erhöhten DKK-1-Werten unterscheiden (1 bis 3 Jahre). Dies spricht für eine mögliche anti-inflammatorischer Aktivität von DKK-1 zu Beginn der SSc, die später durch Hypermethylierung blockiert wird. Der anschließend aktive Wnt-Signalweg vermittelt daraufhin den pro-fibrotischen Effekt von TGF- β .

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass DKK-1 als Inhibitor des Wnt-Signalwegs möglicherweise sehr früh in der Pathophysiologie der Sklerodermie beteiligt ist. Eine Blockierung der DKK-1-Expression hat eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs zur Folge, die wiederum den pro-fibrotischen Effekt des TGF- β , welches durch S1P aktiviert wurde, vermittelt.

1.1. Zusätzliche Untersuchung EC-relevanter Signalmoleküle

Da die bisherigen Ergebnisse die Hypothese einer Endothel-zentrierten Pathophysiologie bei der SSc verstärkten, wurden verschiedene Zytokine im Serum von vier lcSSc-Patienten analysiert. Die Endothelzellen an sich sind die ersten Zellen, die mit dem Blut in Berührung kommen, freigesetzte Zytokine gelangen zuerst an die EC und können dort einen potentielle Wirkung entfalten. Um mögliche Faktoren, die in die Endothelzell-Schädigung involviert sind, zu erfassen, erfolgte diese Untersuchung. Dabei zeigten sich PDGF-AA/AB, IL-4, EMMPRIN, IL-1 α sowie ENA-78 im Serum der untersuchten lcSSc-Patienten als erhöht (Abbildung 31). Davon sind bereits IL-4, PDGF-AA/AB sowie IL-1 α in der Sklerodermie beschrieben worden. Die Serumkonzentrationen von IL-4 und PDGF-AB sind bei SSc-Patienten erhöht (222, 294). Für PDGF-AA/AB ist seit längerem bekannt, dass es eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielt und bei der Wundheilung in Fibroblasten die ECM-Synthese stimuliert (295). IL-4 hingegen ist ein Th2-Zytokin und besäße gegenüber einer Th1- oder Th17-Pathogenese eine anti-inflammatorische Aktivität. Allerdings ist diese, in der tierexperimentell beschriebenen Kategorie, in humanen Erkrankungen oftmals nicht nachvollziehbar.

Das erhöhte IL-1 α ist in die Aktivierung von Fibroblasten via Epithelzellen involviert (296) während der extrazelluläre Induktor der MMPs, EMMPRIN, mit der renalen Krise bei der Sklerodermie assoziiert wird (297). Der bisher nicht für die SSc-beschriebene Faktor ENA-78/CXCL-5, stimuliert die Chemotaxis von Neutrophilen, die angiogenetische Eigenschaften innehaben (298). Diese kurze Abhandlung in den hier in den untersuchten Proben erhöhten Zytokine verdeutlicht, wie vielfältig die pathologischen Prozesse bei der Sklerodermie sind. Dennoch weisen damit zusätzliche Faktoren, u.a. PDGF, IL-4 sowie ENA-78, auf eine entzündliche Schädigung von Endothelzellen hin, die in einem späteren Schritt in die Fibrose, einen gestörten ECM-Abbau siehe EMMPRIN, übergeht.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die hier dargestellten Ergebnisse die ersten Untersuchungen bezüglich der pathophysiologischen Beteiligung der IL-33/ST2-Achse und des Sphingolipid-Signalwegs in der SSc unterstützen. Die erhöhten sST2-Serumspiegel in der späten Phase der SSc und die in der gesamten Sklerodermie gesteigerten Konzentrationen spezifischer Sphingolipide, darunter S1P, und Glucosyl-Ceramide bekräftigt die hier beschriebene Hypothese einer endothelzell-zentrierten Pathophysiologie zu Beginn der SSc, die sich von einem anfänglichem Endothelzellschaden hin zu einem späteren, pro-fibrotischen Milieu entwickelt. Die Korrelation zwischen den Dermatofibrosemarkern COMP sowie Lysyl-Oxidase und S1P unterstützt diese Hypothese. Um diese Ergebnisse vertiefend zu analysieren, bietet es sich an weitere klinisch-deskriptive Analysen von Patienten mit dem Verdacht auf SSc bezüglich der S1P- und sST2-Serumspiegel durchzuführen. Weiterhin empfehlen sich mechanistische *in vitro* Studien mit Endothelzellen und Fibroblasten, die das Zusammenspiel des Sphingolipid-, Wnt- und IL-33-Signalwegs bei der EndMT und einer beginnenden Fibrose analysiert, zu empfehlen. Die daraus gewonnen Erkenntnisse könnten es ermöglichen, dass ein Biomarker-Panel aus S1P, Dermatofibrose-Markern und sST2 für die Diagnose des spezifischen lcSSc-Krankheitsstadiums in der Klinik Anwendung findet. Im weiteren Verlauf könnten diese Experimente bestätigen, dass es sich bei den Sphingolipiden und sST2 um neue, vielversprechende Targets in der Behandlung der lcSSc handelt.

9. Appendix

9.1. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 19.03.2015

Annika Wagner

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Formen der Sklerodermie. Schematische Darstellung der Subgruppen der Familie der Sklerodermie-Erkrankungen).	4
Abbildung 2: Schematischer Überblick über T-Zelldifferenzierung.	10
Abbildung 3: A) Ausbildung der Krallenhand nach eingesetzter Fibrosierung der Finger bei einem SSc-Patienten. Gut sichtbar ist die glatte, gespannte Haut der Finger als Resultat der Hautstraffung und -verdickung. B) Diffuses Sklerödem der Finger eines SSc-Patienten.	13
Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der Stadien des sekundären Raynaud-Phänomens im Vergleich zu der Kapillararchitektur eines gesunden Individuums per Kapillarmikroskopie	15
Abbildung 5: Krankheitsverlauf der limitierten SSc im Vergleich zur diffusen SSc	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Erhebung des mRSS	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Grundaufbaus der Sphingolipide	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung der humanen Ceramid- und Sphingolipidsynthese	29
Abbildung 9: Verknüpfungen des TGF- β - und S1P-Signalwegs.	31
Abbildung 10: Splicevarianten des IL-33 und dessen Funktionen	33
Abbildung 11: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges	35
Abbildung 12: CRP- und Kreatinin-Serumkonzentrationen aller lcSSc-Patienten des Frankfurter Kollektiv	54
Abbildung 13: Erythrozyten- und Leukozyten-Konzentration im Blut der lcSSc-Patienten der Frankfurter Kohorte	55
Abbildung 14: Quantitative Auswertung der kapillarmikroskopischen Untersuchung	56
Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung des frühen, aktiven und späten Stadiums der Kapillarveränderungen in der lcSSc per Nagelfalz-Videokapillaroskopie	57
Abbildung 16: (A) sST2- und (B) IL-33-Serumspiegel der unterschiedlichen SSc-Patienten- und Kontrollgruppen.	61
Abbildung 17: Auswertung der Signalintensität des Proteinarrays für ST2	62
Abbildung 18: Einzelaufstellung der S1P-, dhS1P- sowie Sphingosin-Serumkonzentrationen der SSc-Patienten und Probanden.	65
Abbildung 19: Vergleich der, per LC-MS/MS gemessenen, S1P-Serumspiegel der gesunden Probanden und der lcSSc-Patienten aus der Frankfurter und Karolinska-Kohorte. ...	66
Abbildung 20: Ceramid- und Sphingolipid-LC-MS/MS-Analyse gesunder Probanden aus dem Karolinska- und dem Frankfurter Kollektiv	67
Abbildung 21: Resultate der S1P-, dhS1P- und Sphingosin-Serumspiegel-Messung der SSc-Patienten und der Kontrollgruppen.	69
Abbildung 22: Ceramid-Plasmaspiegel der schwedischen lcSSc-Patienten	72
Abbildung 23: Sphingolipid-Plasmaspiegel der schwedischen lcSSc-Patienten	73
Abbildung 24: Glucosyl-Ceramid-Plasmaspiegel der schwedischen lcSSc-Patienten	74

Abbildung 25: Vergleich des S1P-Gehalts im Serum und im Plasma der (A) schwedischen und (B) deutschen lcSSc-Proben.....	75
Abbildung 26: Normierte und angegliche S1P-Plasmaäquivalente der schwedischen und deutschen lcSSc-Patienten und Kontrollindividuen.	76
Abbildung 27: Resultate des COMP-ELISA der SSc-Patienten und der Kontrollgruppen.....	78
Abbildung 28: Lysl-Oxidase-Serumspiegel ausgewählter lcSSc-, 1.Raynaud-Patienten (1.RP) und gesunder Probanden (Ctrl)	80
Abbildung 29: Per ELISA detektierte Serumlevel des Dickkopf-1-ähnlichem Proteins (DKK-1) der SSc-Patienten und der Kontrollgruppen.	81
Abbildung 30: Darstellung eines Films mit zwei entwickelten Arrays für (links) einen gesunden Proband (Nr. 11) und (rechts) einen lcSSc-Patienten (Nr. 19) aus der Frankfurter Kohorte.....	85
Abbildung 31: Densitometrische Auswertung des Cytokine-XL Arrays von 4 lcSSc-Patienten und 4 gesunden Probanden..	86
Abbildung 32: Prozentuale Veränderungen nach der fünftägigen Iloprost-Behandlung bei lcSSc mit sekundärem Raynaud Phänomen der (A) S1P-, (B) dhS1P- und (C) Sphingosin-Serumkonzentration..	88
Abbildung 33: Prozentuale Veränderungen nach der fünftägigen Iloprostbehandlung bei lcSSc mit sekundärem Raynaud Phänomen (n = 7) der (A) sST2- sowie (B) IL-33-Serumkonzentration.	89
Abbildung 34: Prozentuale Veränderungen nach der fünftägigen Iloprostbehandlung bei lcSSc mit sekundärem Raynaud Phänomen (n = 7) der (A) COMP- sowie (B) DKK-1-Serumkonzentration.	90
Abbildung 35: Schematische Darstellung der Serumspiegel von S1P, sST2 und der Dermatofibrosemarker COMP und Lysyl-Oxidase bezüglich im Verlauf der SSc..	110

9.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht bekannter, mit SSc assoziierten Genen und deren Funktionen (verändert nach (33))	7
Tabelle 2: Die ACR/EULAR-Kriterien (2013) zur Klassifizierung von definitiver systemischer Sklerose und deren Gewichtung	20
Tabelle 3: Antikörper-Diagnostik bei systemischer Sklerose (modifiziert nach (6))	23
Tabelle 4: Kriterien der Amerikanischen Akademie der Rheumatologie (ACR) zur Klassifizierung von systemischer Sklerose (81).	42
Tabelle 5: Charakteristika des Frankfurter und Karolinska-Normalkollektivs.....	43
Tabelle 6: Charakteristika der deutschen und schwedischen Patienten mit Systemischer Sklerose.	44
Tabelle 7: Semi-quantitativer Score zur Verwendung bei der Erstellung des mRSS	46
Tabelle 8: Beurteilung der Hautbeteiligung anhand des mRSS	46
Tabelle 9: Zusammensetzung der Standardreihe und der Proben für die Sphingolipidextraktion. .	48
Tabelle 10: Kapillarmikroskopischer Status der Stockholmer Kohorte im Vergleich zu den Frankfurter lcSSc-Patienten.	58
Tabelle 11: Autoantikörperstatus im Serum der lcSSc-Patienten im Vergleich zu den dcSSc-Patienten (gemischte Kohorte).	59
Tabelle 12: Kormobiditäten der lcSSc-Patienten im Vergleich zu den dcSSc-Patienten.....	60
Tabelle 13: Überblick der per LC-MS/MS analysierten Sphingolipide, Ceramide und Glucysolceramide der lcSSc-Plasmaproben.....	70
Tabelle 14: Korrelationsanalyse bekannter Biomarker (COMP, Lysyl-Oxidase) für die Dermatofibrose bei der SSc und S1P und dhS1P (Analyse mittels Spearmans Korrelationskoeffizient).	82
Tabelle 15: Korrelationsanalyse zwischen der Erkrankungsdauer und den Serumspiegel diverser Marker in SSc-Patienten (Analyse mittel Spearmans Korrelationskoeffizient).	83
Tabelle 16: Korrelationsanalyse bekannter Biomarker (COMP, Lysyl-Oxidase) für die Dermatofibrose bei der SSc und sST2 (Analyse mittels Spearmans Korrelationskoeffizient, Spearmans Rho).	84

9.4. Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antikörper
Abb.	Abbildung
ACA	Anti-centromere Antikörper
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalcium
CO ₂	Kohlendioxid
COMP	Knorpeloligomatrixprotein
CTFG	Wachstumsfaktor des Bindegewebes
Da	Dalton
dcSSc	diffuse SSc
dest.	destilliert
dhS1P	Dihydrosphingosin-1-phosphat
DKK-1	Dickkopf-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Elektrochemilumineszenz
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMMPRIN	extrazellulärer Induktor der Matrixmetalloproteinasen
<i>et al.</i>	<i>Et alterii</i> (engl., und andere)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
g	Gramm
x g	Gravitation Erdbeschleunigung
h	human; Stunden
HCl	Salzsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
l	Liter
lcSSc	auf die Haut limitierte SSc
LPS	Lipopolysaccharid
kb	Kilobasenpaare
μ	mikro
m	milli; Meter; murin
M	molar
MeOH	Methanol
MELK	Multi-Epitop-Ligandenkartographie

min	Minuten
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Majorhistokompatibilitätskomplex
mRSS	modifizierter Rodnan-Skin-Score
n	Nano; Anzahl der Stichprobe
N ₂	Stickstoff
NaN ₃	Natriumazid
n. b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
n. s.	nicht signifikant
%	Prozent
p.A.	<i>Pro analysi</i> (Für die Analyse)
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH	<i>Potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität)
1.RP	primäres, idiopathisches Raynaud-Phänomen
2. RP	sekundäres Raynaud-Phänomen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive oxygene Spezies
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
rv	<i>Reverse</i> (revers)
s	Sekunde
S.	Seite
SSc	Systemische Sklerose
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
Tris	Tris(hydroxymehtyl)aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit)
v	Volumen
vgl.	vergleiche mit
vwF	Von Willebrand-Faktor
x	-fach/multipliziert

9.5. Literaturverzeichnis

1. Ingegnoli F, Ardoino I, Boracchi P, Cutolo M. Nailfold capillaroscopy in systemic sclerosis: Data from the EULAR scleroderma trials and research (EUSTAR) database. *Microvascular Research* 2013; 89: 122–8.
2. Hudson M, Fritzler MJ, Baron M. Systemic Sclerosis. *Medicine* 2010; 89(3): 159–65.
3. Venkataraman K, Thangada S, Michaud J, Oo ML, Ai Y, Lee Y et al. Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *Biochem. J.* 2006; 397(3): 461–71.
4. Bergis D, Kassis V, Ranglack A, Koeberle V, Piiper A, Kronenberger B et al. High Serum Levels of the Interleukin-33 Receptor Soluble ST2 as a Negative Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol* 2013; 6(3): 311–8.
5. M Gintrac. Note sur la sclérodémie. *Rev Med Chir Paris* 2 1847; (2): 263–81.
6. Manger B, Schmidt KL. Checkliste XXL Rheumatologie: 94 Tabellen. 3rd ed. Stuttgart, New York: Thieme; 2005. (Checklisten der aktuellen Medizin).
7. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol.* 2005; 26(11): 587–95.
8. Medsger TA, Masi AT. Epidemiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Ann. Intern. Med.* 1971; 74(5): 714–21.
9. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE, Smith EA, Harper FE, Nussbaum AI et al. Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum.* 1989; 32(8): 998–1006.
10. Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(8): 2246–55.
11. Steen VD, Oddis CV, Conte CG, Janoski J, Casterline GZ, Medsger TA. Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(3): 441–5.
12. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24(2): 165–70.
13. Della Rossa A, Valentini G, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. I. Clinical and epidemiological features of 290 patients from 19 centres. *Ann. Rheum. Dis.* 2001; 60(6): 585–91.
14. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(6): 1359–62.

-
15. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: Systematic review and meta-analysis. *Semin. Arthritis Rheum.* 2014.
 16. Ferri C, Sebastiani M, Lo Monaco A, Iudici M, Giuggioli D, Furini F et al. Systemic sclerosis evolution of disease pathomorphosis and survival. Our experience on Italian patients' population and review of the literature. *Autoimmunity Reviews* 2014.
 17. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 1988; 15(2): 202–5.
 18. Cozzani E, Javor S, Laborai E, Drosera M, Parodi A. Endothelin-1 Levels in Scleroderma Patients: A Pilot Study. *ISRN Dermatology* 2013; 2013(2): 1–4.
 19. Vettori S, Cuomo G, Iudici M, D'Abrosca V, Giacco V, Barra G et al. Early Systemic Sclerosis: Serum Profiling of Factors Involved in Endothelial, T-cell, and Fibroblast Interplay is Marked by Elevated Interleukin-33 Levels. *J Clin Immunol* 2014.
 20. Denton CP, Bickerstaff MC, Shiwen X, Carulli MT, Haskard DO, Dubois RM et al. Serial circulating adhesion molecule levels reflect disease severity in systemic sclerosis. *Br. J. Rheumatol.* 1995; 34(11): 1048–54.
 21. Hafner F, Thomas G, Froehlich H, Steidl K, Brodmann M. Effect of a sequential therapy of bosentan and iloprost versus a monotherapy with bosentan in the treatment of scleroderma related digital ulcers. *Int Angiol* 2011; 30(5): 493–5.
 22. Dooley A, Gao B, Bradley N, Abraham DJ, Black CM, Jacobs M et al. Abnormal nitric oxide metabolism in systemic sclerosis: increased levels of nitrated proteins and asymmetric dimethylarginine. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45(6): 676–84.
 23. Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 1998; 25(2): 314–7.
 24. Andersen GN, Caidahl K, Kazzam E, Petersson AS, Waldenström A, Mincheva-Nilsson L et al. Correlation between increased nitric oxide production and markers of endothelial activation in systemic sclerosis: findings with the soluble adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(5): 1085–93.
 25. Paik Y, Kim J, Aoyama T, Minicis S de, Bataller R, Brenner DA. Role of NADPH Oxidases in Liver Fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 2014; 20(17): 2854–72.
 26. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 2003; 200(4): 500–3.
 27. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36(6): 1031–7.

-
28. Martin P, Teodoro WR, Velosa APP, Morais J de, Carrasco S, Christmann RB et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012; 11(11): 827–35.
 29. Jimenez SA. Role of Endothelial to Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of the Vascular Alterations in Systemic Sclerosis. *ISRN Rheumatology* 2013; 2013(1): 1–15.
 30. Gladman DD, Keystone EC, Baron M, Lee P, Cane D, Mervert H. Increased frequency of HLA-DR5 in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1981; 24(6): 854–6.
 31. Hughes P, Gelsthorpe K, Doughty RW, Rowell NR, Rosenthal FD, Sneddon IB. The association of HLA-B8 with visceral disease in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1978; 31(3): 351–6.
 32. Kallenberg CG, van der Voort-Beelen JM, D'Amaro J, The TH. Increased frequency of B8/DR3 in scleroderma and association of the haplotype with impaired cellular immune response. *Clin. Exp. Immunol.* 1981; 43(3): 478–85.
 33. Jin J, Chou C, Lima M, Zhou D, Zhou X. Systemic Sclerosis is a Complex Disease Associated Mainly with Immune Regulatory and Inflammatory Genes. *Open Rheumatol J* 2014; 8: 29–42.
 34. Allanore Y, Saad M, Dieudé P, Avouac J, Distler JHW, Amouyel P et al. Genome-Wide Scan Identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as Novel Risk Loci for Systemic Sclerosis. *PLoS Genet* 2011; 7(7): e1002091.
 35. Wang J, Guo X, Yi L, Guo G, Tu W, Wu W et al. Association of HLA-DPB1 with scleroderma and its clinical features in Chinese population. *PLoS ONE* 2014; 9(1): e87363.
 36. Zhou XD, Yi L, Guo XJ, Chen E, Zou HJ, Jin L et al. Association of HLA-DQB1*0501 with scleroderma and its clinical features in Chinese population. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013; 26(3): 747–51.
 37. Reveille JD, Durban E, MacLeod-St Clair MJ, Goldstein R, Moreda R, Altman RD et al. Association of amino acid sequences in the HLA-DQB1 first domain with antitopoisomerase I autoantibody response in scleroderma (progressive systemic sclerosis). *J. Clin. Invest.* 1992; 90(3): 973–80.
 38. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Inoko H. HLA class II genes associated with anticentromere antibody in Japanese patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Ann. Rheum. Dis.* 1995; 54(12): 983–7.
 39. Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suárez H et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18(11): 2071–7.
 40. Gourh P, Agarwal SK, Divecha D, Assassi S, Paz G, Arora-Singh RK et al. Polymorphisms in TBX21 and STAT4 increase the risk of systemic sclerosis: evidence of possible gene-

gene interaction and alterations in Th1/Th2 cytokines. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(12): 3794–806.

41. Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45(6): 694–702.
42. Gorlova O, Martin J, Rueda B, Koeleman BPC, Ying J, Teruel M et al. Identification of novel genetic markers associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis through a genome-wide association strategy. *PLoS Genet.* 2011; 7(7): e1002178.
43. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Fajardy I, Diot E et al. Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(1): 225–33.
44. Lefebvre V, Behringer RR, Crombrughe B de. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthr. Cartil.* 2001; 9: S69-75.
45. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Basic immunology: Functions and disorders of the immune system.* 4th ed. Philadelphia, Pa: Saunders; 2011.
46. Mosmann TR, Kobie JJ, Lee FE, Quataert SA. T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation. *Immunol. Res.* 2009; 45(2-3): 173–84.
47. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* 2008; 223: 87–113.
48. Fujimura K, Oyamada A, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. CD4 T cell-intrinsic IL-2 signaling differentially affects Th1 and Th17 development. *J. Leukoc. Biol.* 2013; 94(2): 271–9.
49. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(11): 2455–63.
50. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *J. Immunol.* 2012; 188(8): 3573–83.
51. Deleuran B, Abraham DJ. Possible implication of the effector CD4+ T-cell subpopulation TH17 in the pathogenesis of systemic scleroderma. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3(12): 682–3.
52. Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer J, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(10): 3459–67.
53. Valentini G, Baroni A, Esposito K, Naclerio C, Buommino E, Farzati A et al. Peripheral blood T lymphocytes from systemic sclerosis patients show both Th1 and Th2 activation. *J. Clin. Immunol.* 2001; 21(3): 210–7.

-
54. Fujii H, Hasegawa M, Takehara K, Mukaida N, Sato S. Abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2002; 130(3): 548–56.
55. Hunzelmann N. Systemische Sklerodermie. Humanmed kompakt 2013.
56. Alantar A, Cabane J, Hachulla E, Princ G, Ginisty D, Hassin M et al. Recommendations for the care of oral involvement in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Care Res* 2011; 63(8): 1126–33.
57. Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Plá V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Ramos-Casals M, Campillo-Grau M et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Clinical Pattern According to Cutaneous Subsets and Immunological Status. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2012; 41(6): 789–800.
58. Heidrich H. Functional vascular diseases: Raynaud's syndrome, acrocyanosis and erythromelalgia. *VASA* 2010; 39(1): 33–41.
59. Herrick AL. The pathogenesis, diagnosis and treatment of Raynaud phenomenon. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8(8): 469–79.
60. Cutolo M, Sulli A, Secchi ME, Pizzorni C. Kapillarmikroskopie und rheumatische Erkrankungen: State of the art. *Z Rheumatol* 2006; 65(4): 290–6.
61. Mould TL, Roberts-Thomson PJ. Pathogenesis of telangiectasia in scleroderma. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2000; 18(4): 195–200.
62. Thoua NM, Bunce C, Brough G, Forbes A, Emmanuel AV, Denton CP. Assessment of gastrointestinal symptoms in patients with systemic sclerosis in a UK tertiary referral centre. *Rheumatology* 2010; 49(9): 1770–5.
63. Zeidler H, Zeidler-Zacher-Hiepe. Interdisziplinäre klinische Rheumatologie: Innere Medizin, Orthopädie, Immunologie ; mit 247 Tabellen. Berlin [u.a.]: Springer; 2001.
64. Harrison E, Herrick AL, McLaughlin JT, Lal S. Malnutrition in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2012; 51(10): 1747–56.
65. Schölmerich J. Medizinische Therapie 2005/2006. Berlin: Springer; 2005.
66. Kelly CA. Lung disease in rheumatic disorders. London: Baillière, Tindall; 1993. (Baillière's clinical rheumatology Vol. 7, No 1).
67. Wells AU, Steen V, Valentini G. Pulmonary complications: one of the most challenging complications of systemic sclerosis. *Rheumatology* 2009; 48 (Supplement 3): iii40.
68. Steen VD, Medsger TA. The palpable tendon friction rub: an important physical examination finding in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(6): 1146–51.
69. Steen VD, Medsger TA. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43(11): 2437–44.

-
70. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81(2): 139–53.
 71. Nikpour M, Baron M. Mortality in systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology* 2014; 26(2): 131–7.
 72. Wollheim FA. Classification of systemic sclerosis. Visions and reality. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(10): 1212–6.
 73. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M et al. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(8): 1185–92.
 74. Diab S, Dostrovsky N, Hudson M, Tatibouet S, Fritzler MJ, Baron M et al. Systemic sclerosis sine scleroderma: a multicenter study of 1417 subjects. *J. Rheumatol.* 2014; 41(11): 2179–85.
 75. Geirsson AJ, Steinsson K, Guthmundsson S, Sigurthsson V. Systemic sclerosis in Iceland. A nationwide epidemiological study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1994; 53(8): 502–5.
 76. Pérez-Bocanegra C, Solans-Laqué R, Simeón-Aznar CP, Campillo M, Fonollosa-Pla V, Vilardell-Tarrés M. Age-related survival and clinical features in systemic sclerosis patients older or younger than 65 at diagnosis. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49(6): 1112–7.
 77. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2001; 28(7): 1573–6.
 78. Mierau R, Moinsadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res. Ther.* 2011; 13(5): R172.
 79. Villalta D, Imbustaro T, Di Giovanni S, Lauriti C, Gabini M, Turi MC et al. Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012; 12(2): 114–20.
 80. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1980; 23(5): 581–90.
 81. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2013; 72(11): 1747–55.
 82. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the

progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: A twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(12): 3902–12.

83. Valentini G, Marcoccia A, Cuomo G, Iudici M, Vettori S. The concept of early systemic sclerosis following 2013 ACR/EULAR criteria for the classification of systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rev* 2014; 10(1): 38–44.
84. Rodnan GP, Lipinski E, Luksick J. Skin thickness and collagen content in progressive systemic sclerosis and localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1979; 22(2): 130–40.
85. Klippel JH, Dieppe P. *Rheumatology*. 2nd ed. London, Philadelphia: Mosby; ©1998.
86. van den Hoogen FH, Boerbooms AM, Swaak AJ, Rasker JJ, van Lier HJ, van de Putte LB. Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial. *Br. J. Rheumatol.* 1996; 35(4): 364–72.
87. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR, Baron M, Ellman M, Carette S et al. A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(6): 1351–8.
88. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354(25): 2655–66.
89. Hoyles RK, Ellis RW, Wellsbury J, Lees B, Newlands P, Goh NSL et al. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of corticosteroids and intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine for the treatment of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(12): 3962–70.
90. Filaci G, Cutolo M, Scudeletti M, Castagneto C, Derchi L, Gianrossi R et al. Cyclosporin A and iloprost treatment of systemic sclerosis: clinical results and interleukin-6 serum changes after 12 months of therapy. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38(10): 992–6.
91. Pope J, Fenlon D, Thompson A, Shea B, Furst D, Wells G et al. Iloprost and cisaprost for Raynaud's phenomenon in progressive systemic sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; (2): CD000953.
92. Wigley FM, Wise RA, Seibold JR, McCloskey DA, Kujala G, Medsger TA et al. Intravenous iloprost infusion in patients with Raynaud phenomenon secondary to systemic sclerosis. A multicenter, placebo-controlled, double-blind study. *Ann. Intern. Med.* 1994; 120(3): 199–206.
93. Thompson AE, Shea B, Welch V, Fenlon D, Pope JE. Calcium-channel blockers for Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(8): 1841–7.
94. Rademaker M, Cooke ED, Almond NE, Beacham JA, Smith RE, Mant TG et al. Comparison of intravenous infusions of iloprost and oral nifedipine in treatment of

Raynaud's phenomenon in patients with systemic sclerosis: a double blind randomised study. *BMJ* 1989; 298(6673): 561–4.

95. Scorza R, Caronni M, Mascagni B, Berruti V, Bazzi S, Micallef E et al. Effects of long-term cyclic iloprost therapy in systemic sclerosis with Raynaud's phenomenon. A randomized, controlled study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2001; 19(5): 503–8.
96. Kowal-Bielecka O, Landewe R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirjak L et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Annals of the Rheumatic Diseases* 2009; 68(5): 620–8.
97. Korn JH, Mayes M, Matucci Cerinic M, Rainisio M, Pope J, Hachulla E et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(12): 3985–93.
98. Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, Mayes MD, Hsu VM, Carpentier P et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70(1): 32–8.
99. Badesch DB, Abman SH, Simonneau G, Rubin LJ, McLaughlin VV. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: updated ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2007; 131(6): 1917–28.
100. Barst RJ, Langleben D, Badesch D, Frost A, Lawrence EC, Shapiro S et al. Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47(10): 2049–56.
101. Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353(20): 2148–57.
102. Elhai M, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis: Recent insights. *Joint Bone Spine* 2014.
103. Allanore Y, Borderie D, Avouac J, Zerkak D, Meune C, Hachulla E et al. High N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels and low diffusing capacity for carbon monoxide as independent predictors of the occurrence of precapillary pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(1): 284–91.
104. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J. Rheumatol.* 2000; 27(1): 149–54.
105. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Bellando-Randone S, Conforti ML, Ibba-Manneschi L et al. Increased serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase-12 in patients with systemic sclerosis: correlation with severity of skin and pulmonary fibrosis and vascular damage. *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71(6): 1064–72.

-
106. Moinzadeh P, Krieg T, Hellmich M, Brinckmann J, Neumann E, Müller-Ladner U et al. Elevated MMP-7 levels in patients with systemic sclerosis: correlation with pulmonary involvement. *Exp. Dermatol.* 2011; 20(9): 770–3.
 107. Kim W, Min S, Cho M, Hong K, Shin Y, Park S et al. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7(1): R71-9.
 108. Asano Y, Ihn H, Kubo M, Jinnin M, Mimura Y, Ashida R et al. Clinical significance of serum levels of matrix metalloproteinase-13 in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45(3): 303–7.
 109. Ciechomska M, Huigens CA, Hügler T, Stanly T, Gessner A, Griffiths B et al. Toll-like receptor-mediated, enhanced production of profibrotic TIMP-1 in monocytes from patients with systemic sclerosis: role of serum factors. *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 72(8): 1382–9.
 110. Rimar D, Rosner I, Nov Y, Slobodin G, Rozenbaum M, Halasz K et al. Brief Report: Lysyl Oxidase Is a Potential Biomarker of Fibrosis in Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatology* 2014; 66(3): 726–30.
 111. Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 1992; 31(9): 593–8.
 112. Hesselstrand R, Kassner A, Heinegård D, Saxne T. COMP: a candidate molecule in the pathogenesis of systemic sclerosis with a potential as a disease marker. *Ann. Rheum. Dis.* 2008; 67(9): 1242–8.
 113. Hesselstrand R, Wildt M, Bozovic G, Andersson-Sjöland A, Andréasson K, Scheja A et al. Biomarkers from bronchoalveolar lavage fluid in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease relate to severity of lung fibrosis. *Respir Med* 2013; 107(7): 1079–86.
 114. Hesselstrand R, Andréasson K, Wuttge DM, Bozovic G, Scheja A, Saxne T. Increased serum COMP predicts mortality in SSc: results from a longitudinal study of interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(5): 915–20.
 115. Johann Ludwig Wilhelm. A treatise on the chemical constitution of the brain: Based throughout upon original researches. London: Bailliere, Tindall and Cox; 1884.
 116. van Brocklyn JR. Dual Actions of Sphingosine-1-Phosphate: Extracellular through the Gi-coupled Receptor Edg-1 and Intracellular to Regulate Proliferation and Survival. *The Journal of Cell Biology* 1998; 142(1): 229–40.
 117. Zondag GC, Postma FR, Etten IV, Verlaan I, Moolenaar WH. Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem. J.* 1998; 330 (Pt 2): 605–9.

-
118. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004; 427(6972): 355–60.
 119. Cinamon G, Matloubian M, Lesneski MJ, Xu Y, Low C, Lu T et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat. Immunol.* 2004; 5(7): 713–20.
 120. An S, Zheng Y, Bleu T. Sphingosine 1-Phosphate-induced Cell Proliferation, Survival, and Related Signaling Events Mediated by G Protein-coupled Receptors Edg3 and Edg5. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(1): 288–96.
 121. Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine-1-phosphate: A Janus-faced mediator of fibrotic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2013; 1831(1): 239–50.
 122. Huwiler A, Pfeilschifter J. New players on the center stage: Sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochemical Pharmacology* 2008; 75(10): 1893–900.
 123. Xiong Y, Hla T. S1P Control of Endothelial Integrity. p. 85–105.
 124. Grin’kina NM, Karnabi EE, Damania D, Wadgaonkar S, Muslimov IA, Wadgaonkar R et al. Sphingosine Kinase 1 Deficiency Exacerbates LPS-Induced Neuroinflammation. *PLoS ONE* 2012; 7(5): e36475.
 125. Narayan S, Thomas EA. Sphingolipid abnormalities in psychiatric disorders: a missing link in pathology? *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; 16: 1797–810.
 126. Messner MC, Cabot MC. Glucosylceramide in humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 688: 156–64.
 127. Grösch S, Schiffmann S, Geisslinger G. Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research* 2012; 51(1): 50–62.
 128. Ren S, Babelova A, Moreth K, Xin C, Eberhardt W, Doller A et al. Transforming growth factor- β 2 upregulates sphingosine kinase-1 activity, which in turn attenuates the fibrotic response to TGF- β 2 by impeding CTGF expression. *Kidney Int* 2009; 76(8): 857–67.
 129. Shiohira S, Yoshida T, Sugiura H, Nishida M, Nitta K, Tsuchiya K. Sphingosine-1-phosphate acts as a key molecule in the direct mediation of renal fibrosis. *Physiol Rep* 2013; 1(7) eCollection.
 130. Xiu L, Chang N, Yang L, Liu X, Yang L, Ge J et al. Intracellular Sphingosine 1-Phosphate Contributes to Collagen Expression of Hepatic Myofibroblasts in Human Liver Fibrosis Independent of Its Receptors. *The American Journal of Pathology* 2014.
 131. Radeke HH, Wenckstern H von, Stoldtner K, Sauer B, Hammer S, Kleuser B. Overlapping signaling pathways of sphingosine 1-phosphate and TGF- β in the murine Langerhans cell line XS52. *J. Immunol.* 2005; 174(5): 2778–86.

-
132. Sauer B, Vogler R, Wenckstern H von, Fujii M, Anzano MB, Glick AB et al. Involvement of Smad signaling in sphingosine 1-phosphate-mediated biological responses of keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(37): 38471–9.
133. Xin C, Ren S, Kleuser B, Shabahang S, Eberhardt W, Radeke H et al. Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor-beta-induced cell responses. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(34): 35255–62.
134. Milara J, Navarro R, Juan G, Peiro T, Serrano A, Ramon M et al. Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition. *Thorax* 2012; 67(2): 147–56.
135. Sobel K, Menyhart K, Killer N, Renault B, Bauer Y, Studer R et al. Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Receptor Agonists Mediate Pro-fibrotic Responses in Normal Human Lung Fibroblasts via S1P2 and S1P3 Receptors and Smad-independent Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288(21): 14839–51.
136. Huang LS, Berdyshev E, Mathew B, Fu P, Gorshkova IA, He D et al. Targeting sphingosine kinase 1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal* 2013; 27(4): 1749–60.
137. Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J et al. Sphingosine Kinase 1 (SPHK1) Is Induced by Transforming Growth Factor- and Mediates TIMP-1 Up-regulation. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(52): 53994–4001.
138. Bu S. Dihydrosphingosine 1-phosphate stimulates MMP1 gene expression via activation of ERK1/2-Ets1 pathway in human fibroblasts. *The FASEB Journal* 2005.
139. Bu S, Kapanadze B, Hsu T, Trojanowska M. Opposite effects of dihydrosphingosine 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate on transforming growth factor-beta/Smad signaling are mediated through the PTEN/PPM1A-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(28): 19593–602.
140. Bu S, Asano Y, Bujor A, Highland K, Hant F, Trojanowska M. Dihydrosphingosine-1 phosphate has a potent anti-fibrotic effect in Scleroderma fibroblasts via normalization of PTEN levels. *Arthritis Rheum* 2010: NA.
141. Herzinger T, Kleuser B, Schäfer-Korting M, Korting HC. Sphingosine-1-phosphate signaling and the skin. *Am J Clin Dermatol* 2007; 8(6): 329–36.
142. Tokumura A, Carbone LD, Yoshioka Y, Morishige J, Kikuchi M, Postlethwaite A et al. Elevated serum levels of arachidonoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis. *Int J Med Sci* 2009; 6(4): 168–76.
143. Thuy AV, Reimann C, Hemdan NYA, Gräler MH. Sphingosine 1-Phosphate in Blood: Function, Metabolism, and Fate. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34(1): 158–71.
144. Ulrych T, Böhm A, Polzin A, Daum G, Nüsing RM, Geisslinger G et al. Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011; 9(4): 790–8.
-

-
-
145. Ono Y, Kurano M, Ohkawa R, Yokota H, Igarashi K, Aoki J et al. Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: close correlation between platelet count and serum sphingosine 1-phosphate concentration. *Lipids Health Dis* 2013; 12(1): 20.
 146. Bode C, Sensken S, Peest U, Beutel G, Thol F, Levkau B et al. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J. Cell. Biochem.* 2010; n/a.
 147. Tani M, Sano T, Ito M, Igarashi Y. Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *J. Lipid Res.* 2005; 46(11): 2458–67.
 148. Hänel P, Andréani P, Gräler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 2007; 21(4): 1202–9.
 149. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 2007; 316(5822): 295–8.
 150. Sattler KJE, Elbasan S, Keul P, Elter-Schulz M, Bode C, Gräler MH et al. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res. Cardiol.* 2010; 105(6): 821–32.
 151. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 69–94.
 152. Green JA, Suzuki K, Cho B, Willison LD, Palmer D, Allen CDC et al. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P₂ maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* 2011; 12(7): 672–80.
 153. Jung B, Obinata H, Galvani S, Mendelson K, Ding B, Skoura A et al. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Dev. Cell* 2012; 23(3): 600–10.
 154. Zhang G, Xu S, Qian Y, He P. Sphingosine-1-phosphate prevents permeability increases via activation of endothelial sphingosine-1-phosphate receptor 1 in rat venules. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 299(5): H1494-504.
 155. Waeber C, Blondeau N, Salomone S. Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors. *Drug News Perspect.* 2004; 17(6): 365–82.
 156. Bigaud M, Guerini D, Billich A, Bassilana F, Brinkmann V. Second generation S1P pathway modulators: research strategies and clinical developments. *Biochim. Biophys. Acta* 2014; 1841(5): 745–58.
 157. Lee J, Gordon S, Estrada R, Wang L, Siow DL, Wattenberg BW et al. Balance of S1P1 and S1P2 signaling regulates peripheral microvascular permeability in rat cremaster muscle vasculature. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 2008; 296(1): H33.

-
-
158. Del Galdo S, Vettel C, Heringdorf DMz, Wieland T. The activation of RhoC in vascular endothelial cells is required for the S1P receptor type 2-induced inhibition of angiogenesis. *Cellular Signalling* 2013; 25(12): 2478–84.
159. Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, Hla T. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27(6): 1312–8.
160. Inoki I, Takuwa N, Sugimoto N, Yoshioka K, Takata S, Kaneko S et al. Negative regulation of endothelial morphogenesis and angiogenesis by S1P2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 346(1): 293–300.
161. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2002; 20(5 Suppl 27): S1-13.
162. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett.* 1989; 258(2): 301–4.
163. Werenskiold AK, Hoffmann S, Klemenz R. Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 1989; 9(11): 5207–14.
164. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005; 23(5): 479–90.
165. Préfontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J. Immunol.* 2009; 183(8): 5094–103.
166. Moussion C, Ortega N, Girard J. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS ONE* 2008; 3(10): e3331.
167. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology* 2010; 130(2): 172–80.
168. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre D, Americh L, Aguilar L et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104(1): 282–7.
169. Manetti M, Ibba-Manneschi L, Liakouli V, Guiducci S, Milia AF, Benelli G et al. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2010; 69(3): 598–605.
170. Cayrol C, Girard J. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106(22): 9021–6.

-
171. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 2009; 31(1): 84–98.
 172. Lefrançois E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard J et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012; 109(5): 1673–8.
 173. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 149(2): 217–25.
 174. Li H, Tago K, Io K, Kuroiwa K, Arai T, Iwahana H et al. The cloning and nucleotide sequence of human ST2L cDNA. *Genomics* 2000; 67(3): 284–90.
 175. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(36): 26369–80.
 176. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T et al. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285(5): 1377–83.
 177. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelman K, Wohlfert EA et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 2014; 513(7519): 564–8.
 178. Lee HY, Rhee CK, Kang JY, Byun JH, Choi JY, Kim SJ et al. Blockade of IL-33/ST2 ameliorates airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Exp. Lung Res.* 2014; 40(2): 66–76.
 179. Oh K, Seo MW, Lee GY, Byoun O, Kang H, Cho S et al. Airway epithelial cells initiate the allergen response through transglutaminase 2 by inducing IL-33 expression and a subsequent Th2 response. *Respir. Res.* 2013; 14: 35.
 180. Cho K, Suh JW, Sohn JH, Park JW, Lee H, Kang JL et al. IL-33 induces Th17-mediated airway inflammation via mast cells in ovalbumin-challenged mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2012; 302(4): L429–40.
 181. Yang Q, Li G, Zhu Y, Liu L, Chen E, Turnquist H et al. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(11): 3351–60.
 182. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S et al. The Alarmin Interleukin-33 Drives Protective Antiviral CD8⁺ T Cell Responses. *Science* 2012; 335(6071): 984–9.
 183. Skon CN, Lee J, Anderson KG, Masopust D, Hogquist KA, Jameson SC. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 2013; 14(12): 1285–93.

-
184. Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *Clin Rheumatol* 2011; 30(6): 825–30.
185. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Rosa I, Ceccarelli C, Mello T et al. Differential expression of junctional adhesion molecules in different stages of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(1): 247–57.
186. Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S et al. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(18): 10823–6.
187. Hart MJ, los Santos R de, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol.* 1998; 8(10): 573–81.
188. Jho E, Zhang T, Domon C, Joo C, Freund J, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22(4): 1172–83.
189. Tolwinski NS, Wieschaus E. A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS Biol.* 2004; 2(4): E95.
190. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997; 16(13): 3797–804.
191. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3(7): 683–6.
192. Cruciat C, Niehrs C. Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013; 5(3): a015081.
193. NUSSE R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005; 15(1): 28–32.
194. Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 2012; 492(1): 1–18.
195. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 2007; 315(5812): 642–5.
196. van der Zee M, Jia Y, Wang Y, Heijmans-Antonissen C, Ewing PC, Franken P et al. Alterations in Wnt- β -catenin and Pten signalling play distinct roles in endometrial cancer initiation and progression. *J. Pathol.* 2013; 230(1): 48–58.
197. Yang Z, Sun L, Nie H, Liu H, Liu G, Guan G. Connective tissue growth factor induces tubular epithelial to mesenchymal transition through the activation of canonical Wnt signaling in vitro. *Ren Fail* 2014: 1–7.

-
198. Song P, Zheng J, Xu J, Liu J, Wu L, Liu C. β -catenin induces A549 alveolar epithelial cell mesenchymal transition during pulmonary fibrosis. *Mol Med Rep* 2014.
199. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* 2014; 7(344): re8.
200. Hamburg E, DiNuscio GJ, Mullin NK, Lafayatis R, Atit RP. Sustained β -catenin activity in dermal fibroblasts promotes fibrosis by up-regulating expression of extracellular matrix protein-coding genes. *J. Pathol.* 2014.
201. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Comms* 2012; 3: 735.
202. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R et al. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: A novel mouse model for scleroderma? *Arthritis & Rheumatism* 2011; 63(6): 1707–17.
203. Lemaire R, Farina G, Bayle J, Dimarzio M, Pendergrass SA, Milano A et al. Antagonistic Effect of the Matricellular Signaling Protein CCN3 on TGF- β - and Wnt-Mediated Fibrillinogenesis in Systemic Sclerosis and Marfan Syndrome. *J Investig Dermatol* 2010; 130(6): 1514–23.
204. Cutolo M, Smith V, Sulli A. Atlas of capillaroscopy in rheumatic diseases. Milano: Elsevier Srl; op. 2010.
205. Schmidt H, Schmidt R, Geisslinger G. LC-MS/MS-analysis of sphingosine-1-phosphate and related compounds in plasma samples. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006; 81(3-4): 162–70.
206. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 1993; 365(6446): 557–60.
207. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(6): 403–15.
208. Ni X, Epshtein Y, Chen W, Zhou T, Xie L, Garcia JGN et al. Interaction of integrin β 4 with S1P receptors in S1P- and HGF-induced endothelial barrier enhancement. *J. Cell. Biochem.* 2014; 115(6): 1187–95.
209. Rüger K, Ottenlanger F, Schröder M, Živković A, Stark H, Pfeilschifter JM et al. Modulation of IL-33/ST2-TIR and TLR Signalling Pathway by Fingolimod and Analogues in Immune Cells. *Scand J Immunol* 2014; 80(6): 398–407.
210. Xiong Y, Yang P, Proia RL, Hla T. Erythrocyte-derived sphingosine 1-phosphate is essential for vascular development. *J. Clin. Invest.* 2014; 124(11): 4823–8.
211. Cutolo M, Sulli A, Smith V. Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(10): 578–87.

-
212. Hammad SM, Pierce JS, Soodavar F, Smith KJ, Al Gadban MM, Rembiesa B et al. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *The Journal of Lipid Research* 2010; 51(10): 3074–87.
213. Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N et al. Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J. Biochem.* 1997; 121(5): 969–73.
214. Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology* 2012; 51(6): 1017–26.
215. Salazar GA, Assassi S, Wigley F, Hummers L, Varga J, Hinchcliff M et al. Antinuclear antibody-negative systemic sclerosis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2014.
216. Chora I, Guiducci S, Manetti M, Romano E, Mazzotta C, Bellando-Randone S et al. Vascular biomarkers and correlation with peripheral vasculopathy in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 2015; 14(4): 314–22.
217. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: Evidence That Systemic Sclerosis Is a Vascular Disease. *Arthritis & Rheumatism* 2013; 65(8): 1953–62.
218. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Impaired Angiogenesis in Systemic Sclerosis: The Emerging Role of the Antiangiogenic VEGF165b Splice Variant. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2011; 21(7): 204–10.
219. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H et al. Serum Adhesion Molecule Levels as Prognostic Markers in Patients with Early Systemic Sclerosis: A Multicentre, Prospective, Observational Study. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e88150.
220. Liakouli V, Cipriani P, Marrelli A, Alvaro S, Ruscitti P, Giacomelli R. Angiogenic cytokines and growth factors in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 2011; 10(10): 590–4.
221. Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Ogawa F, Shimizu K, Sato S. Increased circulating soluble vascular adhesion protein-1 levels in systemic sclerosis: association with lower frequency and severity of interstitial lung disease. *Int J Rheum Dis* 2013; 16(4): 442–7.
222. Riccieri V, Stefanantoni K, Vasile M, Macrì V, Sciarra I, Iannace N et al. Abnormal plasma levels of different angiogenic molecules are associated with different clinical manifestations in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2011; 29(2 Suppl 65): S46-52.
223. Bassyouni IH, Gheita TA, Talaat RM. Clinical significance of serum levels of sCD36 in patients with systemic sclerosis: preliminary data. *Rheumatology* 2011; 50(11): 2108–12.
224. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Role of Cellular Senescence and NOX4-Mediated Oxidative Stress in Systemic Sclerosis Pathogenesis. *Curr Rheumatol Rep* 2015; 17(1).

-
225. Hussein H, Lee P, Chau C, Johnson SR. The Effect of Male Sex on Survival in Systemic Sclerosis. *The Journal of Rheumatology* 2014; 41(11): 2193–200.
226. Wipff J, Dieudé P, Avouac J, Hachulla E, Cracowski J, Diot E et al. Association study of CRP gene in systemic sclerosis in European Caucasian population. *Rheumatol Int* 2014; 34(3): 389–92.
227. Steen V, Domsic RT, Lucas M, Fertig N, Medsger TA. A clinical and serologic comparison of African American and Caucasian patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 2012; 64(9): 2986–94.
228. Hoffmann-Vold A, Midtvedt O, Molberg O, Garen T, Gran JT. Prevalence of systemic sclerosis in south-east Norway. *Rheumatology* 2012; 51(9): 1600–5.
229. Cutolo M, Pizzorni C, Tuccio M, Burrioni A, Craviotto C, Basso M et al. Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(6): 719–26.
230. Sulli A, Soldano S, Pizzorni C, Montagna P, Secchi ME, Villaggio B et al. Raynaud's Phenomenon and Plasma Endothelin: Correlations with Capillaroscopic Patterns in Systemic Sclerosis. *The Journal of Rheumatology* 2009; 36(6): 1235–9.
231. Caramaschi P, Volpe A, Canestrini S, Bambara LM, Faccini G, Carletto A et al. Correlation between homocysteine plasma levels and nailfold videocapillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *Clin. Rheumatol.* 2007; 26(6): 902–7.
232. Del Rosso A, Distler O, Milia AF, Emanuelli C, Ibba-Manneschi L, Guiducci S et al. Increased circulating levels of tissue kallikrein in systemic sclerosis correlate with microvascular involvement. *Ann. Rheum. Dis.* 2005; 64(3): 382–7.
233. Dunne JV, Keen KJ, van Eeden SF. Circulating angiopoietin and Tie-2 levels in systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2013; 33(2): 475–84.
234. Avouac J, Walker UA, Hachulla E, Riemekasten G, Cuomo G, Carreira PE et al. Joint and tendon involvement predict disease progression in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2014.
235. Rehberger P, Müller H, Günther C, Schmitt J. Treatment satisfaction and health status in patients with systemic sclerosis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2012; 10(12): 905–11.
236. Motegi S, Toki S, Yamada K, Uchiyama A, Ishikawa O. Demographic and clinical features of systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III antibodies. *J Dermatol* 2015; 42(2): 189–92.
237. Domsic RT. Scleroderma. *Current Opinion in Rheumatology* 2014; 26(6): 646–52.
238. Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan TK et al. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *J. Immunol.* 2010; 184(3): 1526–35.

-
-
239. Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie ANJ, McInnes IB, Liew FY. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(10): 2779–86.
240. Terras S, Opitz E, Moritz RKC, Hoxtermann S, Gambichler T, Kreuter A. Increased serum IL-33 levels may indicate vascular involvement in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2012; 72(1): 144–5.
241. Manetti M, Guiducci S, Ceccarelli C, Romano E, Bellando-Randone S, Conforti ML et al. Increased circulating levels of interleukin 33 in systemic sclerosis correlate with early disease stage and microvascular involvement. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70(10): 1876–8.
242. duPont NC, Wang K, Wadhwa PD, Culhane JF, Nelson EL. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: Determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *Journal of Reproductive Immunology* 2005; 66(2): 175–91.
243. Lefrancais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard J et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; 109(5): 1673–8.
244. Glück J, Rymarczyk B, Rogala B. Serum IL-33 but not ST2 level is elevated in intermittent allergic rhinitis and is a marker of the disease severity. *Inflamm. Res.* 2012; 61(6): 547–50.
245. Voloshyna I, Mucci T, Sher J, Fonacier LS, Littlefield MJ, Carsons S et al. Plasma IL-33 in atopic patients correlates with pro-inflammatory cytokines and changes cholesterol transport protein expression: a surprising neutral overall impact on atherogenicity. *Clin. Exp. Allergy* 2015.
246. Raeiszadeh Jahromi S, Mahesh PA, Jayaraj BS, Madhunapantula SRV, Holla AD, Vishweswaraiah S et al. Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study. *J Asthma* 2014; 51(10): 1004–13.
247. Tajima S, Bando M, Ohno S, Sugiyama Y, Oshikawa K, Tominaga S et al. ST2 gene induced by type 2 helper T cell (Th2) and proinflammatory cytokine stimuli may modulate lung injury and fibrosis. *Exp. Lung Res.* 2007; 33(2): 81–97.
248. Weinberg EO. ST2 protein in heart disease: from discovery to mechanisms and prognostic value. *Biomarkers Med.* 2009; 3(5): 495–511.
249. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(2): 103–10.
250. Miller AM, Liew FY. The IL-33/ST2 pathway - A new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* 2011; 131(2): 179–86.
251. Martínez-Martínez E, Miana M, Jurado-López R, Rousseau E, Rossignol P, Zannad F et al. A role for soluble ST2 in vascular remodeling associated with obesity in rats. *PLoS ONE* 2013; 8(11): e79176.

-
252. Shao D, Perros F, Caramori G, Meng C, Dormuller P, Chou P et al. Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014; 451(1): 8–14.
253. Dowd PM, Martin MF, Cooke ED, Bowcock SA, Jones R, Dieppe PA et al. Treatment of Raynaud's phenomenon by intravenous infusion of prostacyclin (PGI₂). *Br. J. Dermatol.* 1982; 106(1): 81–9.
254. Belch JJ, Newman P, Drury JK, Capell H, Leiberman P, James WB et al. Successful treatment of Raynaud's Syndrome with prostacyclin. *Thromb. Haemost.* 1981; 45(3): 255–6.
255. Cutolo M, Zampogna G, Vremis L, Smith V, Pizzorni C, Sulli A. Longterm effects of endothelin receptor antagonism on microvascular damage evaluated by nailfold capillaroscopic analysis in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2013; 40(1): 40–5.
256. D'Amelio P, Cristofaro MA, D'Amico L, Veneziano L, Roato I, Sassi F et al. Iloprost modulates the immune response in systemic sclerosis. *BMC Immunol.* 2010; 11: 62.
257. Della Bella S, Molteni M, Mocellin C, Fumagalli S, Bonara P, Scorza R. Novel mode of action of iloprost: in vitro down-regulation of endothelial cell adhesion molecules. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001; 65(2-3): 73–83.
258. Tinazzi E, Dolcino M, Puccetti A, Rigo A, Beri R, Valenti MT et al. Gene expression profiling in circulating endothelial cells from systemic sclerosis patients shows an altered control of apoptosis and angiogenesis that is modified by iloprost infusion. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12(4): R131.
259. Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J. Cell Biol.* 1991; 114(1): 155–67.
260. Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 2012; 22(1): 50–60.
261. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8): 604–16.
262. Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* 2013; 141(1): 5–9.
263. Saito M, Saito M. Involvement of Sphingolipids in Ethanol Neurotoxicity in the Developing Brain. *Brain Sciences* 2013; 3(2): 670–703.
264. Venkataraman K, Lee Y, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL et al. Vascular Endothelium As a Contributor of Plasma Sphingosine 1-Phosphate. *Circulation Research* 2008; 102(6): 669–76.
265. Bollinger JG, Ii H, Sadilek M, Gelb MH. Improved method for the quantification of lysophospholipids including enol ether species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *The Journal of Lipid Research* 2010; 51(2): 440–7.
-

-
266. Scherer M, Böttcher A, Schmitz G, Liebisch G. Sphingolipid profiling of human plasma and FPLC-separated lipoprotein fractions by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2011; 1811(2): 68–75.
267. Cutignano A, Chiuminatto U, Petruzzello F, Vella FM, Fontana A. UPLC–MS/MS method for analysis of sphingosine 1-phosphate in biological samples. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2010; 93(1-2): 25–9.
268. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999; 99(3): 301–12.
269. Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT et al. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J. Clin. Invest.* 2001; 108(5): 689–701.
270. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 2006; 9(3): 225–38.
271. LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C, O'Reilly T, Wyder L, Sanchez T et al. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res.* 2006; 66(1): 221–31.
272. Camaré C, Trayssac M, Garmy-Susini B, Mucher E, Sabbadini R, Salvayre R et al. Oxidized LDL-induced angiogenesis involves sphingosine 1-phosphate: prevention by anti-S1P antibody. *Br J Pharmacol* 2015; 172(1): 106–18.
273. Gabrielli LA, Castro PF, Godoy I, Mellado R, Bourge RC, Alcaïno H et al. Systemic Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction is Associated With an Attenuated Acute Vascular Response to Inhaled Prostanoid in Pulmonary Artery Hypertension Patients. *Journal of Cardiac Failure* 2011; 17(12): 1012–7.
274. Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y, Livshitz V, Schapira D, Markovits D, Rozin A et al. Antioxidant status after iloprost treatment in patients with Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis. *Clin. Rheumatol.* 2007; 26(9): 1517–21.
275. Rehberger P, Beckheinrich-Mrowka P, Haustein UF, Sticherling M. Prostacyclin Analogue Iloprost Influences Endothelial Cell-associated Soluble Adhesion Molecules and Growth Factors in Patients with Systemic Sclerosis: A Time Course Study of Serum Concentrations. *Acta Derm Venerol* 2009; 89(3): 245–9.
276. Birukova AA, Tian Y, Dubrovskiy O, Zebda N, Sarich N, Tian X et al. VE-cadherin trans-interactions modulate Rac activation and enhancement of lung endothelial barrier by iloprost. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227(10): 3405–16.
277. Harijith A, Pendyala S, Reddy NM, Bai T, Usatyuk PV, Berdyshev E et al. Sphingosine Kinase 1 Deficiency Confers Protection against Hyperoxia-Induced Bronchopulmonary

Dysplasia in a Murine Model. *The American Journal of Pathology* 2013; 183(4): 1169–82.

278. Schenten V, Melchior C, Steinckwich N, Tschirhart EJ, Brechard S. Sphingosine kinases regulate NOX2 activity via p38 MAPK-dependent translocation of S100A8/A9. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 89(4): 587–96.
279. Schwalm S, Döll F, Römer I, Bubnova S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine kinase-1 is a hypoxia-regulated gene that stimulates migration of human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 368(4): 1020–5.
280. Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine kinase 1 is critically involved in nitric oxide-mediated human endothelial cell migration and tube formation. *Br. J. Pharmacol.* 2010; 160(7): 1641–51.
281. Agarwal P, Zwolanek D, Keene DR, Schulz J, Blumbach K, Heinegard D et al. Collagen XII and XIV, New Partners of Cartilage Oligomeric Matrix Protein in the Skin Extracellular Matrix Suprastructure. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287(27): 22549–59.
282. Farina G, Lemaire R, Korn JH, Widom RL. Cartilage oligomeric matrix protein is overexpressed by scleroderma dermal fibroblasts. *Matrix Biol.* 2006; 25(4): 213–22.
283. Farina G, Lemaire R, Pancari P, Bayle J, Widom RL, Lafyatis R. Cartilage oligomeric matrix protein expression in systemic sclerosis reveals heterogeneity of dermal fibroblast responses to transforming growth factor. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2009; 68(3): 435–41.
284. Gheita TA, Hussein H. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in systemic sclerosis (SSc): Role in disease severity and subclinical rheumatoid arthritis overlap. *Joint Bone Spine* 2012; 79(1): 51–6.
285. Gellings Lowe N, Swaney JS, Moreno KM, Sabbadini RA. Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor- β -stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research* 2008; 82(2): 303–12.
286. Li S, Yang X, Li W, Li J, Su X, Chen L et al. N-acetylcysteine downregulation of lysyl oxidase activity alleviating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respiration* 2012; 84(6): 509–17.
287. Cheng T, Liu Q, Zhang R, Zhang Y, Chen J, Yu R et al. Lysyl oxidase promotes bleomycin-induced lung fibrosis through modulating inflammation. *J Mol Cell Biol* 2014; 6(6): 506–15.
288. O'Connor JW, Gomez EW. Biomechanics of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition: implications for fibrosis and cancer. *Clin Transl Med* 2014; 3(1): 23.
289. Abu El-Asrar AM, Hertogh G de, van den Eynde K, Alam K, van Raemdonck K, Opdenakker G et al. Myofibroblasts in proliferative diabetic retinopathy can originate

from infiltrating fibrocytes and through endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT). *Experimental Eye Research* 2015; 132: 179–89.

290. Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am. J. Pathol.* 2011; 179(3): 1074–80.
291. Biressi S, Miyabara EH, Gopinath SD, M. Carlig PM, Rando TA. A Wnt-TGF β 2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice. *Science Translational Medicine* 2014; 6(267): 267ra176.
292. Lafyatis R. Connective tissue disease: SSc—fibrosis takes flight with Wingless inhibition. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8(8): 441–2.
293. Dees C, Schlottmann I, Funke R, Distler A, Palumbo-Zerr K, Zerr P et al. The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2014; 73(6): 1232–9.
294. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 1997; 24(2): 328–32.
295. Pierce GF, Mustoe TA, Altmann BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J. Cell. Biochem.* 1991; 45(4): 319–26.
296. Aden N, Nuttall A, Shiwen X, Winter P de, Leask A, Black CM et al. Epithelial Cells Promote Fibroblast Activation via IL-1 α in Systemic Sclerosis. *J Invest Dermatol* 2010; 130(9): 2191–200.
297. Yanaba K, Asano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Hamaguchi Y et al. Increased serum soluble CD147 levels in patients with systemic sclerosis: association with scleroderma renal crisis. *Clin Rheumatol* 2012; 31(5): 835–9.
298. Persson T, Monsef N, Andersson P, Bjartell A, Malm J, Calafat J et al. Expression of the neutrophil-activating CXC chemokine ENA-78/CXCL5 by human eosinophils. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33(4): 531–7.

10. Veröffentlichungen

1. Bergis D, Kassis V, Ranglack A, Koeberle V, Piiper A, Kronenberger B, Zeuzem S, Waidmann O, Radeke HH (2013) High serum levels of the Interleukin 33 receptor soluble ST2 as a negative prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Trans Onc Vol*, 6(3):311-318.
2. Wagner A, Köhm M, Nordin A, Svenungsson E, Behrens F, Radeke HH (2015) Increased serum levels of the IL-33 neutralizing sST2 in limited cutaneous systemic sclerosis. *Scand J Immunol*, *in Revision*

Tagungsbeiträge

- | | |
|----------------|---|
| 12.-16.03.2013 | World Immune Regulation Meeting-VII, Davos (Poster); “Evaluation of Sphingolipids and Interleukin-33 as therapeutic targets in Systemic Sclerosis (SSc) patients.” |
| 26.-29.03.2014 | 9th International Congress on Autoimmunity, Nizza (Poster); “Sphingolipids in the pathogenesis of systemic sclerosis – Validation of the application as diagnostic biomarkers” |
| 12.-17.10.2014 | 2nd International Workshop on Molecular Medicine of Sphingolipids, Kloster Banz (Poster); „Sphingolipids in the pathogenesis of systemic sclerosis – useful new biomarkers? “ |
| 23.-25.10.2014 | 5th European Workshop on Lipid Mediators, Istanbul (Poster); “Sphingolipids: Candidate biomarkers for diagnosis of limited systemic sclerosis and potential prognostic biomarker for treatment outcome of prostacyclin infusions” |

11. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Beteiligten, die diese Arbeit ermöglicht habe, bedanken. Dazu zählen besonders Herr Prof. Dr. Radeke und Frau Prof. Dr. Süß sowie der Leiter des Instituts für allgemeinen Pharmakologie und Toxikologie Herr Prof. Pfeilschifter. Ebenso bin ich all meinem Kooperationspartner zu außerordentlichem Dank verpflichtet: aus der Rheumatologie des Universitätsklinikums Frankfurt Herrn Prof. Dr. Burkhardt, Herrn Dr. Behrens und insbesondere Frau Dr. Köhm sowie Frau Dr. Nordin, Frau Prof. Dr. Svenungsson und Herrn Prof. Jakobsson aus dem Karolinska Institut in Stockholm. Für alle methodische Unterstützung bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Geisslinger, Frau Dr. Ferreirós Bouzas, Herrn Schreiber und Herrn PD Dr. Scholich aus dem Institut für klinische Pharmakologie. Schlussendlich wäre diese Arbeit nicht ohne die finanzielle Unterstützung der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung und deren Doktorandenkolleg TRIP nicht möglich gewesen. Dafür möchte ich mich, stellvertretend für die Stiftung, bei Frau PD Dr. Schultz-Hector bedanken.

12. Lebenslauf

Annika Wagner, geb. Ranglack

Tulpenweg 2, 64823 Groß-Umstadt
geboren am 17. April 1987 in Schorndorf
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Akademische Ausbildung

Seit Februar 2012	Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie der Goethe Universität Frankfurt am Main Promotionsstudentin des Graduiertenkollegs „Translational Research Innovation Pharma (TRIP)“, Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H. H. Radeke
Jan. 2012	Abschluss des Studiums als Diplom-Biologin
Okt. 2006 – Mai 2011	Technische Universität Darmstadt Studium im Fachbereich Biologie, Schwerpunkt Biochemie

Praktische Ausbildung

Jun. 2011 – Jan. 2012	Technische Universität Darmstadt Fachbereich Chemie/Biochemie Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Friedl (Differentielle Genexpression in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen)
-----------------------	--

Schulische Ausbildung

Juli 2006	Allgemeine Hochschulreife
Sept. 1999 – Juli 2006	Max-Planck-Gymnasium in Groß-Umstadt
Sept. 1997 – Juli 1999	Ernst-Reuter-Schule in Groß-Umstadt
Sept. 1993 – Juli 1997	Landrat-Gruber-Schule in Groß-Umstadt